

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN DE CONSORCIOS
BACTERIANOS HIDROCARBONOCLASTAS PARA LA DEGRADACIÓN
DE HIDROCARBUROS TOTALES EN SUELOS CONTAMINADOS.

Por

ERIKA ELIZABETH BARBOSA MIRELES

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS con
orientación en MICROBIOLOGÍA APLICADA

JUNIO 2016

AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN DE CONSORCIOS BACTERIANOS HIDROCARBONOCLASTAS PARA LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS TOTALES EN SUELOS CONTAMINADOS.

Aprobación de la Tesis:

Dr. Ulrico Javier López Chuken

RESUMEN

Erika Elizabeth Barbosa Mireles

Fecha de graduación:

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título de estudio: AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN DE CONSORCIOS BACTERIANOS HIDROCARBONOCLASTAS PARA LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO EN SUELOS CONTAMINADOS.

Número de páginas:

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias
Con orientación en Microbiología Aplicada.

Área de Estudio: Microbiología Aplicada

Propósito y Método de Estudio: La presente investigación se realizó debido a la necesidad de promover y evaluar técnicas naturales, de bajo costo para la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos en el estado de Nuevo León. La contaminación por hidrocarburos totales del petróleo en suelos ha tomado mayor relevancia a nivel mundial ya que el uso generalizado de productos derivados del petróleo ha llevado a un aumento de la probabilidad de introducción accidental de hidrocarburos en el suelo, los hidrocarburos son extremadamente contaminantes, persistentes en el ambiente e inclusive tóxicos con potencial cancerígeno y mutagénico para los seres humanos.

Uno de los mejores enfoques para la restauración de suelos contaminados es hacer uso de microorganismos para degradar los compuestos tóxicos mediante un proceso de biorremediación. La biorremediación es un enfoque atractivo para la limpieza de hidrocarburos del petróleo, ya que es fácil de mantener, aplicable en grandes áreas, rentable y conduce a la destrucción completa del contaminante.

Contribuciones y conclusiones: El consorcio bacteriano hidrocarbonoclasta aislado de un afloramiento natural de petróleo mostró un total de 12 aislados, además del aclimatado a diferentes concentraciones de petróleo (10 %, 25 % y 50 %), dando un total de 15 aislados. Ambos consorcios mostraron tolerancia y crecimiento en medio mínimo mineral Bushnell Haas con petróleo como única fuente de carbono en concentraciones del 1% al 4% en 1000 mL, siendo el consorcio bacteriano hidrocarbonoclasta el de mayor tolerancia. La prueba final de biorremediación incluyó un suelo históricamente contaminado (pasivo ambiental) el cual mostro concentraciones de HTP que superan los LMP de la normatividad nacional de 11500 ppm en zona industrial, con una concentración de HTP de 191,148 mg/kg de suelo seco. Las técnicas de bioestimulación y bioaumentación mostraron porcentajes de remoción adecuados para el periodo de tiempo de estudio, siendo la técnica de bioestimulación la que mostró un mayor porcentaje de remoción por la adición del consorcio bacteriano hidrocarbonoclasta con un índice de remoción del 19.5 % además de realizar el proceso a temperatura ambiente (34.9 °C máxima y 22 °C mínima). El bioensayo de toxicidad con *Phaseolus vulgaris* mostró que el porcentaje de germinación está directamente relacionado con el porcentaje de remoción del contaminante. El consorcio es aplicable para la remoción de contaminantes derivados del petróleo en suelos contaminados.

Dr. Ulrico Javier López Chuken.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, por la paciencia, el apoyo brindado, las enseñanzas profesionales y de vida que me ayudaron a forjar un carácter de productividad, enfocado a una mejor vida profesional y personal, de corazón gracias PhD. Ulrico López Chuken.

A mi familia padres y hermanas, que a pesar de la distancia siempre estuvieron ahí, para darme ánimos cuando las cosas no salían como estaban planeadas, los amo.

A mi novio Manuel Rodríguez, gracias por apoyarme en cada una de mis metas y ser parte de ellas; nos falta aún mucho por recorrer; pero mientras nos apoyemos ,llegar a la meta juntos será lo mejor de este viaje.

A CONACYT por la beca otorgada y hacer posible una de mis metas en la vida.

A la UANL, y la Facultad de Ciencias Químicas por brindarme la oportunidad de desarrollarme en una de las mejores universidades del país; pero sobre todo por tener el gusto de conocer a personas realmente valiosas en el ámbito profesional y personal.

A cada uno de los doctores que contribuyeron en mi formación académica a lo largo de estos dos años, gracias por cada una de sus sugerencias, correcciones y apoyo, son parte fundamental de este trabajo.

A mi comité tutorial la Dra. Ma. Teresa Garza , PhD. Juan Villarreal Chiu y el Dr. Luis H. Alvarez Valencia, gracias por sus valiosas contribuciones.

A mis compañeros de generación Olivia, Albert, Yair y Julio; terminamos siendo casi hermanos, gracias por toda su ayuda, y sobre todo gracias por siempre hacerme sentir en casa.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a las personas más importantes de mi vida, quienes han forjado valores, deseos y metas en mi desde que tengo memoria, a ti hermano que el tiempo que estuviste conmigo fue el suficiente para dejarme un sin fin de enseñanzas, a ti abuela que estás conmigo día con día, a pesar de los años y a mi papá Juan Pablo Barbosa Rodríguez.

A mi madre Ma. Del Socorro Mireles Méndez, eres y serás la persona más valiosa de mi vida, gracias por estar en cada triunfo y derrota por enseñarme que los sueños se hicieron para cumplirse y por formar una mujer independiente, te amo.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	
2. ANTECEDENTES	
2.1. Características principales de los suelos	16
2.1.2 Tipos de suelo en México	
2.2. Problemática ambiental por hidrocarburos en México	18
2.2.1 Clasificación del petróleo o crudo.....	1
2.2.2 La exploración petrolera en México	20
2.2.3 Hidrocarburos totales del petróleo (HTP).....	22
2.2.4 Consecuencias ambientales del derrame de crudo	24
2.2.5 Efectos toxicológicos en seres vivos.....	26
2.3 Normatividad Mexicana del petróleo	
2.4 Tecnologías de remediación de sitios contaminados por hidrocarburos	30
2.4.1 Bioaumentación	
2.4.2 Bioestimulación	
2.4.3 Técnicas <i>ex-situ</i>	
2.4.4 Técnicas <i>in-situ</i>	
2. 5. Afloramientos naturales de hidrocarburos.....	35
2.5.1 Uso de BHCC's como método de biorremediación.....	36
2.5.2 Consorcios bacterianos en la biorremediación de sitios contaminados.....	38
2.6. JUSTIFICACIÓN	
2.7. HIPÓTESIS	
2.8. OBJETIVOS	
2.8.1. Objetivo General.....	
2.8.2 Objetivos Específicos.....	
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	
3.1 Consorcio bacteriano hidrocarbonoclasta.....	4
3.1.1 Muestreo para el aislamiento de consorcio procedente de Veracruz	43
3.1.2. Aislamiento en agar nutritivo	
3.1.3 Crecimiento en medio selectivo de cultivo Bushnell Haas.....	44
3.1.4 Conservación del consorcio en placas de agar petróleo	44
3.2 Aislamiento de rizobacterias.....	
3.3 Aislamiento de consorcio de la zona metropolitana de Monterrey	45
3.3.1 Aclimatación de las muestras de suelo de la ZMM con petróleo.....	46
3.3.2 Aislamiento de consorcio aclimatado con muestras de petróleo en agar nutritivo	47
3.3.3 Crecimiento en medio selectivo de cultivo Bushnell Haas.....	47
3.3.4 Conservación del consorcio en placas de Agar petróleo.....	48
3.4 Caracterización del suelo de estudio.....	
3.4.1 Determinación de la densidad	
3.4.2 Determinación de humedad	
3.4.3 Determinación de pH	
3.4.4 Determinación de materia orgánica (MO).....	52
3.4.5 Determinación de capacidad de campo (CC)	52
4. Diseño Experimental: prueba de biorremediación de un suelo de la ZMM...53	
4.1 Tratamientos	

4.1.1 Bioaumentación.....	56
4.1.2 Bioestimulación	56
5. Extracción de hidrocarburos	56
5.1 Método Agitación-centrifugación	56
5.1.2 Análisis estadístico	61
6. Bioensayo de toxicidad	58
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES	59
7.1 Análisis físico y químico de los parámetros del suelo	59
7.1.2 Suelo procedente de Veracruz.....	60
7.1.3 Suelo procedente de la Zona Metropolitana de Monterrey contaminado con metales pesados.	60
7.1.4 Suelo procedente de la Zona Metropolitana de Monterrey con alta contaminación visible por hidrocarburos del petróleo	61
7.2 Consorcios bacterianos	63
7.2.1 Obtención del consorcio hidrocarbonoclasta	63
7.2.1 Colonias seleccionadas para su aislamiento	64
7.2.3 Caracterización microscópica de las colonias seleccionadas	65
7.2.4 Caracterización microscópica de aislados de rizobacterias	68
7.3 Obtención del consorcio metalófilo tolerante a hidrocarburos	70
7.3.1 Pre- enriquecimiento	71
7.3.2. Aislamiento de consorcio metalófilo.....	72
7.3.2.1 onias aisladas del tratamiento 1 (10% de petróleo).....	74
7.3.2.2 onias aisladas del tratamiento 2 (25% petróleo).....	76
7.3.2.3 onias aisladas del tratamiento 3 (50% petróleo).....	79
7.4 Cinéticas de crecimiento	79
7.4.1 Cinética de crecimiento del consorcio hidrocarbonoclasta	81
7.4.2 Cinética de crecimiento del consorcio metalófilo tolerante a hidrocarburos ..	83
7.5 Crecimiento y propagación en medios selectivo Bushnell Haas	85
7.6 Prueba final de biodegradación en muestra real (pasivo ambiental)	85
7.6.1 Tratamientos	85
7.6.2 Análisis de HTP.....	85
7.6.3 Análisis de varianza de un factor.....	85
7.6.4 Estudio cinético de la remoción de HTP.....	90
7.6.4.1 ioaumentación concentración de HTP (mg kg ⁻¹ de s.s) tras el periodo de prueba	93
7.6.4.2 ioestimulación concentración de HTP (mg Kg ⁻¹ de s.s) tras el periodo de prueba	93
7.7 Bioensayo de toxicidad	99
7.8 Análisis del ciclo de vida del proceso de biorremediación propuesto	102
7.9 Disposición de residuos generados	103
CONCLUSIONES	104
RECOMENDACIONES	107
REFERENCIAS	108

ABREVIACIONES Y SIMBOLOS USADOS

ANA	Atenuación Natural Asistida
API	American Petroleum Institute
ASTDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
BHCC's	Bacterias Hidrocarbonclastas
Bi	Bismuto
Ca	Calcio
CaCl₂	Cloruro de calcio
CC	Capacidad de Campo
Cd	Cadmio
CH₂Cl₂	Cloruro de metileno
CNH	Comisión Nacional de Hidrocarburos
Co	Cobre
CO₂	Dióxido de Carbono
COV's	Compuestos Orgánicos Volátiles
DOF	Diario Oficial de la Federación
EE	Error Estándar
EPA	Environmental Protección Agency
EUA	Estados Unidos de América
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FeCl₃	Cloruro Férrico
HAP	Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos
HTP	Hidrocarburos Totales del Petróleo
IARC	International Agency for Research on Cancer

NAFED	Instituto Nacional para el Federalismo y Desarrollo Municipal
ISRIC	International Soil Reference and Information Center
K₂HPO₄	Difosfato de Potasio
KH₂PO₄	Fosfato de Potasio Monobásico
MgSO₄·7H₂O	Sulfato de sodio heptahidratado
MO	Materia Orgánica
Na₂SO₄	Sulfato de sodio anhidro
NaCl	Cloruro de sodio
NH₄NO₃	Nitrato de amonio
ONU	Organización de las Naciones Unidas
Pb	Plomo
PEMEX	Petróleos Mexicanos
rpm	Revoluciones por minuto
SEMARNAT	Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UNESCO	United Nations Educational Scientific and Cultural Organization
USDA	United States Departament of Agriculture
WHO	Word Healt Organization
ZMM	Zona Metropolitana de Monterrey
Zn	Zinc

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación conforme a su densidad en grados API (American Petroleum Institute)	20
Tabla 2. Límites Máximos Permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelo (mg/Kg) en México.	29
Tabla 3. Ventajas y desventajas de las tecnologías de remediación clasificadas de acuerdo al tipo de tratamiento.	31
Tabla 4. Investigaciones mas sobresalientes en el campo de la biorremediación por medio de bacterias hidrocarbonoclastas, empleando consorcios	39
Tabla 5. Descripción de los tratamientos realizados por triplicado para la aclimatación del suelo con posibles bacterias degradadoras de hidrocarburos	46
Tabla 6. Parámetros físicos y químicos analizados en el suelo estudiando y los métodos seguidos para su determinación	48
Tabla 7. Relación de la temperatura con la densidad del agua	50
Tabla 8. Interpretación de resultados	50
Tabla 9. Composición del Bokashi	54
Tabla 10. Resultados del análisis del análisis físico y químico del suelo de Veracruz. ..	59
Tabla 11. Concentración de metales pesados tomando de Cárdenas (2010)	60
Tabla 12. Parámetros del suelo contaminado con metales pesados tomado de Cárdenas (2010)	61
Tabla 13. Resultados obtenidos del análisis físico químico del suelo contaminado con HTP.	62
Tabla 14. Colonias aisladas del suelo proveniente de afloramiento natural de petróleo en el estado de Veracruz, México.	66
Tabla 15. Colonias aisladas de rizósfera del suelo	67
Tabla 16. Colonias aisladas seleccionadas y su caracterización Gram del consorcio metalófilo tolerante a hidrocarburos	78
Tabla 17. Concentración de HTP (mg/kg de s.s).....	88
Tabla 18. Constantes de rapidez y tiempo estimado para la biorremediación de suelos contaminados con HTP	91
Tabla 19. Porcentajes de germinación obtenidos.....	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principales unidades de suelo en México.....	17
Figura 2. Mayores campos de crudo en la huasteca Veracruzana	20
Figura 3. Volumen derramado en tierra y mar 2000-2014.....	22
Figura 4. Indicadores anuales de petróleo crudo derramado en zona norte y sur, total nacional cuantificado en millones de barriles.....	23
Figura 5. Lugar de la bioaumentación entre los enfoques de la biorremediación.....	35
Figura 6. Sitio de muestreo de la Zona Metropolitana de Monterrey.....	45
Figura 7. Muestra de suelo contaminado por la acción de los HTP (pasivo ambiental).....	62
Figura 8. Suelo proveniente de afloramiento natural de petróleo del estado de Veracruz, México.....	63
Figura 9. Diluciones de siembra por extensión en placa, crecimiento y morfología macroscópica.....	64
Figura 10. Caracterización Gram de cada una de las colonias seleccionadas.....	65
Figura 11. Colonias seleccionadas para su aislamiento.....	67
Figura 12. Caracterización Gram de cada una de las colonias seleccionadas.....	68
Figura 13. Controles empleados para la obtención del consorcio.....	71
Figura 14. Crecimiento y aislamiento de colonias representativas.....	72
Figura 15. Tinciones Gram realizadas para la identificación microscópica de las colonias seleccionadas.....	73
Figura 16. Crecimiento y aislamiento de las colonias representativas del T2.....	74
Figura 17. Tinciones Gram realizadas para la identificación microscópica de las colonias seleccionadas.....	75
Figura 18. Crecimiento y aislamiento de las colonias representativas del T3.....	76
Figura 19. Tinciones Gram realizadas para la identificación microscópica de las colonias seleccionadas.....	77
Figura 20. Curva de crecimiento en medio Bushnell Hass del consorcio bacteriano hidrocarbonoclasta.....	80
Figura 21. Curva de crecimiento en medio Bushnell Hass del consorcio metalófilo tolerante a hidrocarburos del petróleo	82
Figura 22. Bacterias degradadoras de hidrocarburos en aguas profundas después de un derrame de crudo en el golfo	84

Figura 23. Bacterias degradadoras de hidrocarburos	84
Figura 24. Temperatura alcanzada durante el periodo de experimentación	86
Figura 25. Montaje de los tratamientos, para prueba final de biorremediación	86
Figura 26. Comportamiento de los tratamientos de bioaumentación con respecto a la atenuación natural asistida.....	93
Figura 27. Comportamiento de los tratamientos de bioestimulación con respecto a la atenuación natural asistida.....	96
Figura 28. Ejemplo de siembra de <i>Phaseolus vulgaris</i>	99
Figura 29. Tratamientos utilizados para el bioensayo de toxicidad	99
Figura 30. Fases del análisis del ciclo de vida ISO 14040.....	102

INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental y los efectos del cambio climático han ido en aumento en años recientes debido a la actividad humana. Los diferentes tipos de contaminación derivan de las actividades industriales, uso indiscriminado de fertilizantes agrícolas, fugas, emisiones de gases, derrames de hidrocarburos. Estos últimos representan uno de los problemas de mayor impacto al ambiente y sociedad debido a su difícil eliminación y fácil propagación de los mismos una vez que entran en contacto con el agua o el suelo.

El derrame de hidrocarburos del petróleo al suelo tiene impactos importantes en las propiedades naturales del suelo (textura, estructura, humedad, permeabilidad, etc), en la actividad de los microorganismos afectando la funcionalidad de todo el ecosistema. Un número de hidrocarburos han sido descritos como extremadamente contaminantes, persistentes en el ambiente e inclusive tóxicos con potencial cancerígeno y mutagénico para los seres humanos, lo cual ha originado una elevada preocupación debido a las dificultades en la eliminación de ellos desde el medio ambiente. A pesar de su potencial tóxico en el ambiente, una considerable fracción del petróleo e hidrocarburos derivados que ingresan a los sistemas naturales se eliminan naturalmente por la actividad de biodegradación llevada a cabo por comunidades microbianas, en particular por las BHCC' s (bacterias hidrocarbonoclastas).

La abundancia relativa de las BHCC' s varía considerablemente en función de las condiciones ambientales y de la historia de presencia natural o contaminación por hidrocarburos. Poblaciones de microorganismos que degradan hidrocarburos son sustancialmente más altas en las zonas donde ocurre naturalmente el petróleo (como las chapopoterías) o bien que han sido expuestos previamente a los contaminantes derivados del petróleo que en las zonas vírgenes.

Sin embargo para fines de estudios de biorremediación existe limitada información del aislamiento de consorcios bacterianos hidrocarbonoclastas de afloramientos naturales de petróleo crudo (*i.e.* chapopoterías) en comparación de sitios contaminados con hidrocarburos, por lo que será de gran relevancia científica conocer e investigar a las bacterias nativas ahí presentes que han evolucionado naturalmente bajo esas condiciones para evaluar su potencial como degradadoras de hidrocarburos refinados en sitios contaminados en zonas urbanas.

2. ANTECEDENTES

El suelo constituye un recurso natural de gran importancia que desempeña funciones en la superficie terrestre como reactor natural y hábitat de organismos, así como un soporte de infraestructura y fuente de materiales no renovables. Este recurso junto con el agua, el aire y la luz solar son el fundamento de la vida de los ecosistemas terrestres, además de ser un yacimiento de materias primas, como minerales no metálicos de interés para la construcción (piedra, mármol, caliza, yeso, arena), minerales metálicos (blenda, galena, siderita, pirita) y combustibles fósiles como el petróleo (INECC, 2015).

Este sirve como sustrato para la producción de alimentos, fibras y combustibles, además del hábitat de flora, fauna, que juegan un papel central en la determinación de la calidad de nuestro medio ambiente. Los nutrientes del suelo, el agua, la energía solar, y el dióxido de carbono (CO₂) son convertidos a través de la absorción de las plantas y la fotosíntesis en productos vegetales diversos que proporcionan a los seres vivos de hábitat y alimento (Falkenmark y Rockström, 2004; Palm *et al.*, 2007).

2.1. Características principales de los suelos

El suelo desempeña funciones de gran importancia para el sustento de la vida en este planeta, es fuente de alimentos y de biomasa, actúa como medio filtrante de agua, amortiguador y transformador, es hábitat de miles de organismos, y el escenario donde ocurren los ciclos biogeoquímicos. En el suelo se llevan a cabo la mayoría de las actividades humanas, sirviendo de soporte físico, material de construcción y de infraestructura para la agricultura, actividades forestales, recreativas, y agropecuarias, además la socioeconómica como vivienda, industria y carreteras (Volke *et al.*, 2005).

Las características de cada suelo dependen de varios factores, los más importantes son el tipo de roca que los originó, su antigüedad, el relieve, el clima, la vegetación y los animales que viven en él, además de las modificaciones causadas por la actividad humana (FAO, 2015).

Las características del suelo pueden ser físicas, como el color, textura, estructura, porosidad, consistencia, densidad, o bien químicas como el pH y la capacidad de intercambio catiónico, carbono orgánico, nitrógeno; por mencionar algunas (USDA, 2015).

2.1.2 Tipos de suelo en México

En México existen 25 de las 30 unidades de suelo reconocidas por la FAO, UNESCO y la ISRIC. Los leptosoles, regosoles y calcisoles son los suelos de más amplia distribución nacional, cubriendo cerca del 60.7% de la superficie del país, son por lo general suelos someros y con poco desarrollo, lo que dificulta su aprovechamiento agrícola. Los suelos fértiles y más explotados (feozems y vertisoles) ocupan el 18% de la superficie del país como se ejemplifica en el figura 2, (SEMARNAT, 2015).

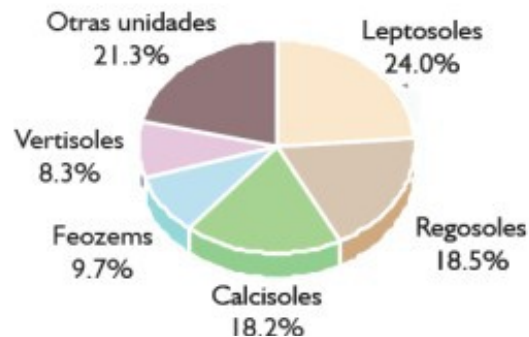


Figura 1. Principales unidades de suelo en México

Fuente: Semarnat, 2015.

Además es un país caracterizado por una compleja topografía, en parte derivada por la actividad volcánica pesada durante el cenozoico. Su gradiente altitudinal va de cero a 5000 metros sobre el nivel del mar; incluye 4 de los 5 tipos de clima reconocidos por la clasificación de Köppen y una gran diversidad de paisajes y tipos de rocas (incluyendo rocas ígneas, sedimentarias y metamórficas). En conjunto, estos elementos contribuyen a explicar la gran diversidad de tipos de suelo en todo el país (SEMARNAT, 2008).

2.2. Problemática ambiental por hidrocarburos en México

La industria petrolera en el territorio nacional es la principal fuentes de ingresos al país, pero también una de las principales fuentes de contaminación del suelo. Las actividades de perforación, extracción, conducción y transformación del petróleo en zonas petroleras han originado la contaminación del suelo y el agua, desde hace más de 40 años (Maldonado *et al.*, 2010). Los hidrocarburos constituyen entre el 50 al 98 % de la composición total del petróleo, los cuales están formados por alcanos, ciclo alcanos y compuestos aromáticos con al menos un anillo bencénico en su estructura (Botello *et al.*, 2005). Son compuestos orgánicos formados por carbono e hidrógeno principalmente, y en menor medida por otros elementos entre los que destacan el azufre, nitrógeno y oxígeno. Debido a las posibilidades de combinación del carbono se presenta en este tipo de compuestos lo que se denomina como isomería, la cual puede definirse brevemente como la propiedad que tienen los compuestos de presentar la misma fórmula condensada, pero diferente estructura molecular (Garnica *et al.*, 2001).

Los compuestos orgánicos presentes, los más comunes son los alquenos, alquenos cíclicos, benceno, tolueno, etilbenceno, xilenos y policíclico hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y fenoles, lo que representa una seria preocupación ambiental por su difícil eliminación (Ubani *et al.*, 2013; Kriipsalu *et al.*, 2008).

Tan solo en el transcurso del año 2014 se presentaron derrames de gran magnitud el primero de ellos en el río San Juan perteneciente al municipio de Cadereyta, Nuevo León en el que se vieron afectados 23 kilómetros de este; el incidente lo provocó una toma clandestina en la acequia usada para el riego de los ejidos San Juan, Mexiquito, Santa Isabel, Dolores, Soledad Herreras y parte del río San Juan que nutre a la presa El Cuchillo (La Jornada, 2014).

Otros incidentes de consideración ocurrieron en el estado de Veracruz el primero de ellos en el río Hondo, perteneciente al municipio de Tierra Blanca, fueron más de 6 kilómetros los que se vieron afectados, ocasionando la muerte de numerosas especies como tortugas, conejos, ratones, tortugas y diversos peces de la región (La Jornada, 2014), además del reportado en el pozo del Águila, asentado en el municipio de Naranjos donde miles de barriles se fugaron sin control, a pesar de los esfuerzos de los técnicos de Pemex por poder controlarlo (El Universal, 2014).

2.2.1 asificación del petróleo o crudo

Por definición, un sistema geológico para la formación de petróleo es un sistema de tres elementos: una roca madre, una roca de atrapamiento y una roca de reservorio. Si uno de estos elementos geológicos no se encuentra, no se puede formar el petróleo (Ollivier y Magot, 2005).

El petróleo se define como líquido natural oleaginoso e inflamable, constituido por una mezcla de hidrocarburos, que se extrae de lechos geológicos continentales o marítimos. Mediante diversas operaciones de destilación y refinación se obtienen de él distintos productos utilizables con fines energéticos o industriales, como la gasolina, la nafta, el queroseno, el gasóleo, etc. (PEMEX, 2014).

El valor del petróleo crudo se determina por su rendimiento en productos refinados y dicho rendimiento depende de sus características físico-químicas, siendo sus principales su contenido de azufre y su densidad (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación conforme a su densidad en grados API (American Petroleum Institute, 2015).

Crudo	Densidad (g/cm ³)	API
Extrapesado	> 1	10.0
Pesado	1.0 - 0.92	10.00 - 22.3
Mediano	0.92 - 0.87	22.3 - 31.1
Ligero	0.87 - 0.83	31.1 - 39.0
Súperligero	< 0.83	39.0

2.2.2 exploración petrolera en México

En México, la exploración del petróleo se inició cerca de las emanaciones de chapopote localizadas en las huastecas potosina y veracruzana; ya que esas áreas representaban referencias superficiales de la presencia de aceite en los estratos de subsuelo.

La perforación de pozos con objetivos petroleros en esa región fue una novedad mundial hacia los años 1920s; con ello México fue reconocido como país petrolero, a la par que el sureste de E.U.A y Venezuela como se muestra en la Figura 2 (Santiago, 2006).



Figura 2. Principales campos de crudo en la huasteca veracruzana.

Las actividades de exploración tienen como productos principales la cuantificación de los recursos prospectivos petroleros y la incorporación de reservas (CNH, 2011).

México es un país rico en recursos naturales y la posibilidad de que en su aprovechamiento, siempre en beneficio de la nación, pueda ahora participar el sector privado, constituye un elemento que requiere de la implementación de una reforma secundaria de gran calado, la actual reforma energética representa una profunda transformación y modernización del modelo energético nacional y la ampliación de herramientas jurídicas con que contara el Estado Mexicano, por un lado, para aprovechar los hidrocarburos y transformarlos en riqueza que signifique mejores condiciones sociales y económicas para los mexicanos y, por el otro, generar un mercado eléctrico sólido y competitivo que coadyuve al crecimiento económico del país (Presidencia de la República, 2015).

Con las nuevas tecnologías emergentes y necesidades de la población surgen nuevas técnicas para el aprovechamiento de los recursos naturales, tal es el caso del fracking el cual es una forma no convencional de extraer gas natural, pero que conlleva una serie de impactos ambientales, algunos de los cuales aún no están plenamente caracterizados o comprendidos entre ellos la contaminación de las aguas subterráneas, contaminación atmosférica, emisión de gases efecto invernadero (metano), terremotos (sismicidad inducida), contaminación acústica e impactos paisajísticos (Williams,2015;Tollefson, 2012).

2.2.3 Hidrocarburos totales del petróleo (HTP)

Los hidrocarburos totales del petróleo (HTP) son una de las fuentes básicas de energía sobre las cuales se sustentan las actividades económicas de todos los países del mundo. Por otra parte, los HTP también son la principal fuente que origina los problemas ambientales más importantes de este siglo, como el smog, el cambio climático global y la liberación de moléculas tóxicas. En países productores, como México y muchos otros, ha conducido a la contaminación de grandes áreas de suelo y agua (Peña *et al.*, 2006).

La medición de los hidrocarburos totales de petróleo (HTP) es una indicación estandarizada del grado de contaminación de suelos que hayan sido afectados de alguna manera por fugas o derrames de productos derivados del petróleo. Entre las sustancias que más comúnmente se encuentran como contaminantes en el suelo se cuentan las gasolinas, aunque esto dependerá del sitio (Figura 3 y 4) (Méndez *et al.*, 2011).

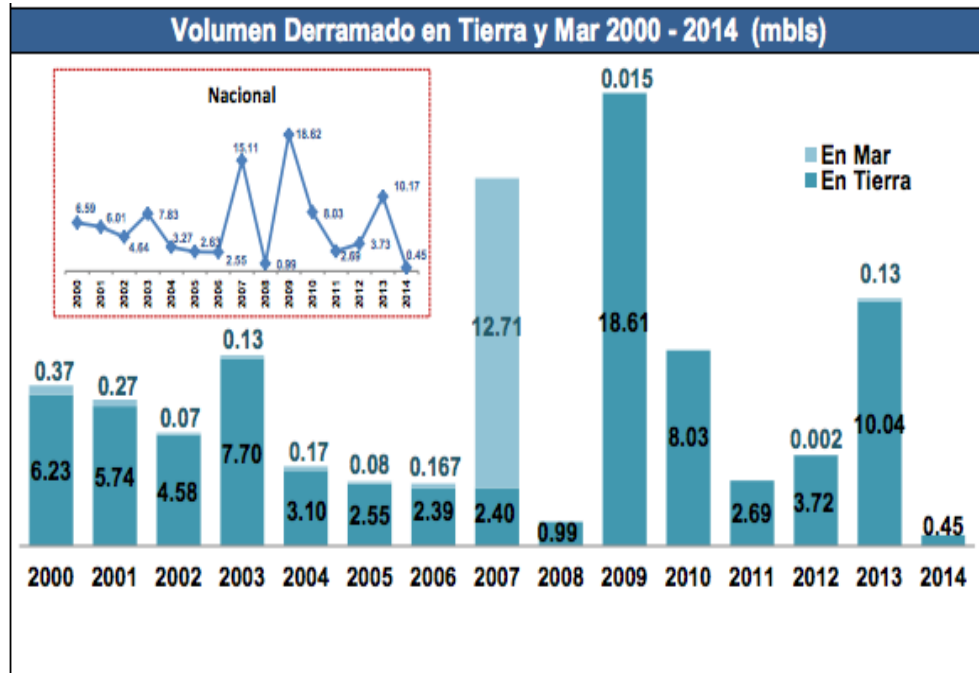


Figura 3. Volumen de tierra y mar 2000-2014 (Comisión Nacional de Hidrocarburos, 2015).

Indicadores Anuales										
Petróleo Crudo Derramado*	2000-2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	Total (mbls)
Zona Norte	21.39	1.37	0.72	0.56	7.90	2.67	1.88	0.77	0.19	37.46
Nuevo León	0.06	0	0	0	0	0	0	0	0	0.06
En tierra	0.06	0	0	0	0	0	0	0	0	0.06
En mar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
Puebla	0.1	0	0.002	0.02	6.33	0.44	0.02	0.007	0.023	6.93
En tierra	0.1	0	0.002	0.02	6.33	0.44	0.02	0.007	0.023	6.93
En mar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
Tamaulipas	0.5	0.02	0.0001	0	0	0	0	0	0	0.54
En tierra	0.48	0.02	0.0001	0	0	0	0	0	0	0.51
En mar	0.04	0	0	0	0	0	0	0	0	0.04
Veracruz	20.71	1.34	0.72	0.54	1.57	2.24	1.87	0.76	0.17	29.92
En tierra	20.70	1.34	0.72	0.54	1.57	2.24	1.87	0.64	0.17	29.79
En mar	0.002	0	0	0	0	0	0	0.13	0	0.13
Zona Sur	12.14	13.74	0.27	18.06	0.13	0.02	1.84	9.394	0.252	55.86
Campeche	1.22	0.002	0	0.003	0	0	0.002	0	0	1.22
En tierra	0.02	0	0	0	0	0	0	0	0	0.02
En mar	1.20	0.002	0	0.003	0	0	0.002	0	0	1.20
Chiapas	1.77	0.20	0.13	15.01	0.01	0	0	0	0	17.12
En tierra	1.77	0.20	0.13	15.01	0.01	0	0	0	0	17.12
En mar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
Tabasco	9.15	13.55	0.14	3.05	0.12	0.02	1.84	9.394	0.252	37.52
En tierra	9.14	0.84	0.14	3.03	0.12	0.02	1.84	9.394	0.252	24.78
En mar	0.01	12.71	0	0.01	0	0	0	0	0	12.74
Total Nacional (mbls)	33.53	15.11	0.99	18.62	8.03	2.69	3.73	10.17	0.45	93.32

Figura 4. Indicadores anuales de petróleo crudo derramado en zona norte y sur, total nacional cuantificado en millones de barriles (Comisión Nacional de Hidrocarburos, 2015).

2.2.4 Consecuencias ambientales del derrame de crudo

La extracción global de hidrocarburos ha resultado en la exposición al ambiente de aproximadamente 25 000 toneladas de petróleo cada año como resultado del daño a pipas con combustible y derrames de contenedores en el mundo (McDonald y Knox, 2014).

Los vertidos accidentales de petróleo también conforman una de las principales fuentes de contaminación en el medio hidrosférico, con un considerable impacto en los organismos vivos que habitan este medio. Una vez vertido el petróleo, este forma una capa muy delgada que se esparce por la superficie y que impide el intercambio de gases; en concreto la entrada de oxígeno atmosférico, así como la incidencia de luz solar, impidiendo el desarrollo de la fotosíntesis (Doménech y Peral, 2006).

Este tipo de contingencias ambientales originan efectos directos sobre la biota, ya que el petróleo contiene compuestos químicos tóxicos que producen daños a plantas, animales y humanos pero principalmente sobre las poblaciones de microorganismos, los cuales representan parte importante del ecosistema y son claves para los procesos biogeoquímicos (Zamora *et al.*, 2012).

La contaminación de suelos se asocia con la entrada de sustancias que, a partir de una cierta concentración, debe de considerarse como no deseable. El suelo puede contener una gran variedad de elementos químicos, por lo que puede parecer difícil establecer a partir de qué momento, un mismo elemento deja de ser beneficioso o indiferente, para pasar a tener la categoría de contaminante. Para determinar la extensión y naturaleza de un sitio contaminado se debe caracterizar el sitio mediante actividades de muestreo y análisis esto proveerá las bases para adquirir la información técnica necesaria para desarrollar, proyectar, analizar y seleccionar técnicas de limpieza más apropiadas (Volke *et al.*, 2005).

En las áreas expuestas al derrame de petróleo se presenta de dos maneras: contaminación superficial y contaminación subsuperficial. La contaminación superficial es aquella que resulta de la cobertura de petróleo en la superficie del suelo. La contaminación subsuperficial se da al cubrirse el petróleo superficial con una capa de sedimento resultante de derrames posteriores (Montoya *et al.*, 2002).

El deterioro del suelo se manifiesta con problemas físicos y químicos, lo cual repercute sobre la actividad biológica ya que los microorganismos son sensibles a los cambios de calidad del suelo (Torres *et al.*, 2006; Medina *et al.*, 2011).

En el suelo los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos físico-químicos simultáneos como evaporación y penetración, que dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida puede ser más o menos lentos, ocasionando una mayor toxicidad, además de tener una moderada, alta o extrema salinidad, dificultando su tratamiento. Altos gradientes de salinidad pueden destruir la estructura terciaria de las proteínas, desnaturalizar enzimas y deshidratar células, lo cual es letal para muchos microorganismos usados para el tratamiento de aguas y suelos contaminados (Benavides *et al.*, 2006).

Aunque el petróleo tiene una gran importancia en la sociedad moderna, presenta varios aspectos negativos, su sola presencia en el ambiente implica una serie de problemas relacionados con la contaminación, la disminución de la calidad del agua, el suelo y de la vida de muchas plantas y animales, pudiendo afectar finalmente, la calidad de vida de los seres humanos (Petit *et al.*, 2013).

Además, otro tipo de derivados del petróleo altamente contaminante son los denominados COVs (Compuestos Orgánicos Volátiles), estos son liberados por la quema de combustibles, como gasolina, madera, carbón o gas natural. También son liberados por disolventes, pinturas, pegamentos y otros productos empleados y almacenados en los hogares y centros de trabajo (U.S. EPA, 1998)

Es por esto que en México, la industria del petróleo en su conjunto ha tenido un impacto negativo en materia ambiental. Debido a la amplia gama de productos derivados del petróleo, no ha sido posible evaluar cuantitativamente la contaminación involucrada desde la fase de explotación hasta la obtención de los productos petroquímicos básicos (Saval, 1995).

El problema de los suelos contaminados con hidrocarburos radica en que hasta hace pocos años no existía conciencia del grado de la dificultad y el costo que representa la remediación de los suelos y cuerpos de agua contaminados para la sociedad (Saval, 1995).

2.2.5 Efectos toxicológicos en seres vivos

La presencia de estos químicos en el medio ambiente provee de serios riesgos a la salud humana (Mrozik y Piotrowska, 2010). Los HTP tienden a bioacumularse en las cadenas alimenticias donde se interrumpen las actividades bioquímicas o fisiológicas de muchos organismos, causando así la carcinogénesis de algunos órganos, la mutagénesis en el material genético, el deterioro en la capacidad de reproducción y / o causar hemorragia en población expuesta. La causa / efecto de los contaminantes del petróleo suelen ser cuantificado mediante parámetros de punto final biológicas conocidas como biomarcadores (Onwurah *et al.*, 2007).

Algunos de los compuestos de los HTP pueden afectar al sistema nervioso así como producir dolores de cabeza y mareo a altos niveles en el aire, otros compuestos pueden causar una afección a los nervios llamada “ neuropatía periferal” , que consiste en adormecimiento de los pies, las piernas, y también pueden producir efectos en la sangre, sistema inmunológico, pulmones, piel y ojos (ATSDR, 1999).

Estudios en animales han demostrado efectos a los pulmones, el sistema nervioso central, el hígado y los riñones a causa de la exposición a compuestos de los HTP. También se ha demostrado que ciertos compuestos de los HTP pueden afectar la reproducción y el feto en animales (ATSDR, 1999).

Los riesgos planteados por la exposición a mezclas de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) han sido evaluados a lo largo del tiempo por diversas organizaciones internacionales (Environmental Protection Agency (EPA) 1984; World Health Organization (WHO) 1995; Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ASTDR) 2012; International Agency for Research on Cancer (IARC) 2010, estableciéndose las características y propiedades carcinogénicas y mutagénicas, de las emisiones así como cada hidrocarburo presente en la mezcla (Vargas *et al.*, 2013), de esta manera se puede comprobar que los Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HAPs) y sus derivados están asociados al aumento en la incidencia de diversos tipo de cáncer en el hombre y animales (Mastandrea *et al.*, 2005).

2.3 Normatividad Mexicana del petróleo

En México la SEMARNAT, (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales) es la dependencia del Gobierno Federal encargada de impulsar la protección, restauración y conservación de los ecosistemas y recursos naturales y bienes y servicios ambientales de México, con el fin de propiciar su aprovechamiento y desarrollo sustentable (Fuente: SEMARNAT, 2012).

En los últimos 30 años, la preocupación por el medio ambiente ha comenzado a incrementar a nivel nacional, generando políticas y programas para prevenir y/o reducir la contaminación producida por la industria del petróleo. Un importante componente de este proceso ha sido el estudio y diagnóstico de las áreas afectadas y la remediación de algunos de los sitios más contaminados. Con respecto a estas actividades la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) publicó la primera norma de suelos contaminados con hidrocarburos en 2002, (NOM-EM-138-ECOL-2002, SEMARNAT 2002), la cual indicaba los criterios de remediación en sitios contaminados y los niveles máximos permisibles de hidrocarburos en suelo.

En marzo de 2005, con el título de NOM-138-SEMARNAT/SS-2003, se establecen cambios en los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación la cual inició su vigencia el 29 de mayo de 2005; pero por cuestiones gubernamentales se realizaron nuevas modificaciones ya que a la fecha de su publicación no se contaba con el Reglamento de la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos, el cual se publicó en el Diario Oficial de la Federación, el 30 de noviembre de 2006 (Adams *et al.*, 2015; DOF 2014).

Durante los primeros cinco años de vigencia de la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003, (Tabla 2) dicha norma se aplicó en múltiples casos de caracterización y remediación, lo que permitió identificar algunas especificaciones susceptibles de mejorar, por lo que el Comité Consultivo Nacional de Medio Ambiente y Recursos Naturales, en su Tercera Sesión Extraordinaria de 2012, aprobó para publicación definitiva la presente Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012. (DOF 2015).

Tabla 2. Límites Máximos Permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelo (mg/kg) en México.

FRACCIÓN DE HIDROCARBUROS	USO DE SUELO PREDOMINANTE (mg/kg BASE SECA)			MÉTODO ANALÍTICO
	Agrícola, forestal, pecuario y de conservación	Residencial y recreativo	Industrial y comercial	
Ligera	200	200	500	NMX-AA-105-SCFI-2008
Mediana	1 200	1 200	5 000	NMX-AA-145-SCFI-2008
Pesada	3 000	3 000	6 000	NMX-AA-134-SCFI-2008

Fuente: NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012

2.4 Tecnologías de remediación de sitios contaminados por hidrocarburos

La remediación, hace referencia a la retirada, reducción o neutralización de sustancias, residuos o materiales peligrosos para prevenir o minimizar cualquier efecto adverso sobre el medio ambiente o la salud humana hasta límites aceptables y esta puede dividirse en remediación biológica (biorremediación) remediación fisicoquímica y remediación térmica (Arranz, 2002; Volke *et al.*, 2002).

Tecnologías de remediación

- **Fisicoquímicas**
 - Extracción de vapores
 - Inyección de aire
 - Aireación
 - Bombeo de agua
 - Enjuague y lavado de suelos
 - Tratamiento electrocinético
- **Biológicas**
 - **Biodegradación *in situ***
 - Bioestimulación *in situ*
 - Bioventing
 - Bioslurping
 - **Biodegradación *ex situ***
 - Landfarming
 - Biopilas
 - Compostaje
- **Térmicas**
 - Incineración
 - Desorción térmica (Fuente: Miliarium, 2008).

Tabla 3. Ventajas y desventajas de las tecnologías de remediación clasificadas de acuerdo al tipo de tratamiento.

	Ventaja	Desventaja
Tratamientos Biológicos	<ul style="list-style-type: none"> - Son efectivos en cuanto a costo - Son tecnologías más benéficas para el ambiente Los contaminantes generalmente son destruidos -Se requiere un mínimo o ningún tratamiento posterior 	<ul style="list-style-type: none"> - Requieren mayores tiempos de tratamiento -Es necesario verificar la toxicidad de intermediarios y/o productos -No puede emplearse si el tipo de suelo no favorece el crecimiento microbiano
Tratamientos Fisicoquímicos	<ul style="list-style-type: none"> -Son efectivos en cuanto a costos -Pueden realizarse en periodos cortos - El equipo es accesible y no se necesita de mucha energía ni ingeniería 	<ul style="list-style-type: none"> - Los residuos generados por técnicas de separación, deben tratarse o disponerse: aumento en costos y necesidad de permisos - Los fluidos de extracción pueden aumentar la movilidad de los contaminantes: necesidad de sistemas de recuperación
Tratamientos Térmicos		<ul style="list-style-type: none"> - Es el grupo de tratamientos más costoso

Fuente: Volke et al., 2002

Como se menciona en la tabla 3, se puede observar que la biorremediación es una de las tecnologías más empleadas, por los beneficios proporcionados y los bajos costos de su aplicación; y ésta se define como la transformación o degradación de contaminantes peligrosos a sus formas químicas menos dañinas, es una atractiva y prometedora tecnología verde. Bacterias son comúnmente usadas, pero otros organismos como hongos, algas o plantas también son empleados (Francis y Nancharaiah, 2015).

La biorremediación; como tecnología ambiental tiene como principal ventaja su versatilidad, ya que es un proceso natural de autosaneamiento ambiental y que puede adaptarse a las necesidades de cada sitio, (Yaima, 2011).

En la naturaleza, la biodegradación es un proceso natural que responde a la contaminación, incluyendo a la contaminación por hidrocarburos de petróleo. La capacidad de los microorganismos para degradar los hidrocarburos y facilitar su mineralización mediante la formación de los compuestos orgánicos más lábiles a través de la ruptura de enlaces intramoleculares se ha estudiado ampliamente (Syakti *et al.*, 2013).

La eficiencia de la biorremediación en suelos contaminados por productos del petróleo depende de las condiciones bióticas y abióticas del proceso. Temperatura, humedad, adición de nutrientes, concentración de oxígeno, tamaño adecuado de las partículas del suelo, y la presencia de sustancias activas en la superficie juegan un papel importante, dando forma a las condiciones que pueden mejorar los procesos de biodegradación de hidrocarburos (Fountoulakis *et al.*, 2009).

2.4.1 aumentación

La bioaumentación implica introducir cultivos (generalmente bacterianos) externos a un suelo contaminado, usualmente en combinación con la bioestimulación (sección 2.4.2.) (Lebkowska *et al.*, 2011; Boopathy, 2000).

Este enfoque corresponde al aumento de las capacidades metabólicas de la microbiota presente en el suelo. Tal aumento es en realidad el resultado de una ampliación de la capacidad genética presente en ese sitio (Dejonghe *et al.*, 2001).

Ying y colaboradores en el 2013 concluyen que la eficiencia del proceso de biorremediación usando la bioaumentación con una cepa específica de levadura *Candida tropicalis* para la remediación de un suelo contaminado con hidrocarburos se ve ampliamente beneficiada por el papel que desarrollan dichos microorganismos.

2.4.2 estimulación

La bioestimulación es la adición de nutrientes, o bien una combinación de condiciones ambientales como la luz, el agua, la temperatura, o físicos como la aireación de un sitio contaminado para promover el crecimiento natural de los microorganismos que participan en la degradación química del contaminante (Mrozik y Piatrowzka, 2010).

Para la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos, se conoce un amplio número de métodos para la remediación, entre los cuales destacan:

2.4.3 Técnicas *ex-situ*

En las técnicas *ex-situ* se excava el material a tratar y se le maneja en un sistema controlado externo, como una celda de “*land farming*” o en algún tipo de biorreactor; mientras que en las técnicas *in-situ* se deja el material contaminado en donde se encuentra (como abajo de un edificio, u otra instalación petrolera, o en el subsuelo, a profundidad), y se tratan de modificar las condiciones en donde está la contaminación para estimular la biodegradación, y así sanear el sitio (Schroeder *et al.*, 1999).

2.4.4 Técnicas *in-situ*

Técnicas *in situ* fisicoquímicas; como el lavado de suelos, venteo, bombeo de agua, inyección de aire, tratamiento electrocinético y biológicas como; *bioventing* y *bioslurping* (bioventeo y biosucción) (Miliarium, 2008).

Sin embargo, debido a la relevancia, magnitud y diversidad de sitios afectados por la contaminación de hidrocarburos, las técnicas biológicas *in-situ* han demostrado que son las más prometedoras por su flexibilidad, bajo costo, adaptabilidad y aplicabilidad bajo condiciones reales. A pesar de sus ventajas, los métodos de tratamiento biológico *in-situ* dependen enteramente de factores ambientales, así como los tipos y niveles de contaminación lo que consecuentemente afecta la capacidad de los microorganismos para degradar hidrocarburos a productos inocuos (dióxido de carbono, agua y biomasa) a través de reacciones bioquímicas (Ferrera *et al.*, 2006).

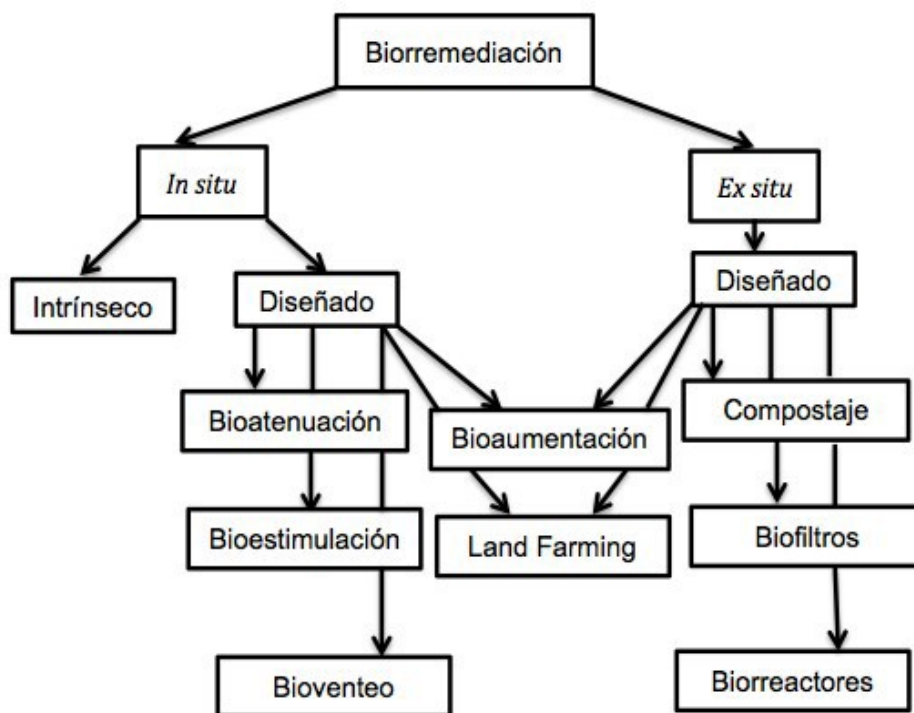


Figura 5. Lugar de la bioaumentación entro los enfoques de la biorremediación.

(Boopathy 2000).

2. 5. Afloramientos Naturales de Hidrocarburos

En México, desde la época prehispánica se tuvo conocimiento de algunos afloramientos naturales de petróleo (chapopoterías). El chapopote (del náhuatl *chapopotli*, palabra compuesta por *tzacutli*, pegamento, y *popochtli*, perfume) era utilizado por los nativos mexicanos para fines medicinales, como impermeabilizante, material de construcción, se quemaba en ritos ceremoniales y era además usado con fines de higiene, para limpiar la dentadura (Pemex, 2008).

El estado de Veracruz se caracteriza por ser uno de los grandes productores de petróleo del país y poseer en su territorio un buen número de chapopoteras. En sitios con estas características han evolucionado un grupo de microorganismos que se conocen como bacterias hidrocarbonoclastas (BHCC), las cuales tienen como característica la capacidad de subsistir con hidrocarburos como fuente de carbono y energía para facilitar su mineralización mediante la formación de los compuestos orgánicos más lábiles a través de la ruptura de enlaces (Madsen 1991).

En el país, se han iniciado algunos trabajos de caracterización de sitios afectados por hidrocarburos, donde el suelo es el factor que más se estudia; sin embargo, esta información primaria no puede generalizarse para el resto del país ya que es dependiente de las condiciones geológicas, climáticas, y de los tipos de suelo de cada región (Gutiérrez y Zavala, 2002).

En la actualidad, México tiene severos problemas de contaminación de agua, suelo y aire tanto por compuestos orgánicos como inorgánicos. Los Hidrocarburos totales de petróleo (HTP) se consideran compuestos de alta prioridad que deben eliminarse de zonas contaminadas en México (Martínez y Rodríguez, 2013). Entre las sustancias que más comúnmente se encuentran como contaminantes en el suelo se cuentan las gasolinas, aunque esto dependerá del sitio (Méndez *et al.*, 2011).

2.5.1 de BHCC's como método de biorremediación

Los incidentes de derrames de petróleo han impulsado el desarrollo de diferentes técnicas físicas, químicas, así como las técnicas biológicas para hacer frente a la contaminación por hidrocarburos, la biorremediación se ha aplicado ampliamente como una exitosa y rentable técnica para tratar diferentes derrames de petróleo en todo el mundo (Raeid *et al.*, 2014).

Las BHCC's se encuentran distribuidos en entornos marinos, suelo y ecosistemas de agua dulce. La abundancia relativa de las bacterias hidrocarbonoclastas, varía considerablemente en función de las condiciones ambientales y de la historia de presencia natural o contaminación por hidrocarburos. Poblaciones de microorganismos que degradan hidrocarburos son sustancialmente más altas en las zonas que han sido expuestas previamente a los contaminantes derivados del petróleo que en las zonas vírgenes. Por lo tanto, las comunidades microbianas adaptadas a los hidrocarburos debido una previa exposición, son más capaces de atacar a los contaminantes de hidrocarburos que las comunidades microbianas que carecen de esa adaptación (Ommen, 1998).

Uno de los mejores enfoques para la restauración de suelos contaminados es hacer uso de microorganismos para degradar los compuestos tóxicos por medio de la biorremediación. La biorremediación es un enfoque atractivo de la limpieza de los hidrocarburos del petróleo, ya que es fácil de mantener, aplicable en grandes áreas, rentable y conduce a la destrucción completa del contaminante (Kumar 2011).

Las comunidades microbianas adaptadas debido a haber evolucionado bajo esas condiciones o debido a una previa exposición, son más capaces de atacar a los contaminantes de hidrocarburos que las comunidades microbianas que carecen de esa adaptación (Souza *et al.*, 2014).

La mayoría de las BHCC's metabolizan hidrocarburos alifáticos o aromáticos, aunque se tiene conocimiento de que, *Rhodococcus* sp. y algunas cepas de *Pseudomonas* sp. han demostrado degradar ambos tipos de hidrocarburos. Entre las bacterias hidrocarbonoclasticas, *Alcanivorax* sp. y *Cycloclasticus* sp. han sido identificadas como microorganismos clave con importantes papeles en la degradación de los hidrocarburos alifáticos y aromáticos, respectivamente, en entornos marinos (Teramoto, 2013).

Estos procesos de biorremediación pueden ser realizados tanto por como bioestimulación como por bioaumentación. En ambos casos, lo que se consigue es una biotransformación de sustancias peligrosas en sustancias menos tóxicas o inocuas (Pucci *et al.*, 2010).

2.5.2 sorcios bacterianos en la biorremediación de sitios contaminados Dell

' Anno *et al.* (2012) destacan la importancia del trabajo con consorcios microbianos para la biorremediación, en dicho estudio, ellos obtuvieron resultados que muestran que las estrategias de biorremediación con gran diversidad microbiana (consorcios) aumentan drásticamente la tasa biodegradación de hidrocarburos en sitios contaminados comparando con microorganismos aislados. Los consorcios microbianos pueden resistir mejor los periodos de limitación de nutrientes debido a la diversidad metabólica disponible por la diversidad de especies, además de tener rangos de acción más amplios en cuanto a temperatura, salinidad, pH, etc, además combinada con la habilidad de compartir metabolitos dentro de la comunidad.

Una población minoritaria puede llegar a ser la más activa en un periodo de limitación de nutrientes si tiene la habilidad metabólica capaz de sostener la supervivencia de todo el consorcio. De hecho, el consorcio contiene unas especies minoritarias las cuales han sido retenidas por selección natural para responder a tal situación (Ochoa y Montoya, 2010).

Tabla 4. Investigaciones más sobresalientes en el campo de la biorremediación por medio de bacterias hidrocarbonoclastas, empleando consorcios.

Autor(es)	Estudio	Lugar de muestreo y tipo de suelo	Microorganismo(s)	Resultados (% de degradación)	Condiciones experimentales
Hernández Acosta <i>et al.</i> 2003	Estudiar la relación de bacterias hidrocarbonoclastas (HCT's) y hongos (HCT's) aisladas de rizósferas de plantas	Minatitlán Veracruz suelo contaminado con 25 000 mg kg ⁻¹ de petróleo crudo	Consortio microbiano por <i>Pseudomonas</i> sp. y <i>Agrobacterium radiobacter</i> y tres especies de hongos por géneros <i>Trichoderma</i> , <i>Aspergillus</i> y <i>Mucor</i>	Las cepas aisladas de la rizósfera de <i>Chamaecrista nictitans</i> y <i>Panicum</i> sp. Fueron: <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Agrobacterium</i> sp. <i>Trichoderma</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp. <i>Mucor</i> sp.	Invernadero 48 días
Maldonado-Chávez <i>et al.</i> 2010	Se evaluó el potencial de un consorcio microbiano constituido por bacterias y hongos	Tabasco Gleysoles, uno testigo y el otro contaminado con petróleo	Bacterias (<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Serratia marcescens</i> y hongos (<i>Aspergillus</i> sp. y <i>Trichoderma</i> sp.))	29% de la disipación del petróleo y en suelo sin consorcio fue 20 % (p < 0.01)	Invernadero 158 días
Kadali <i>et al.</i> , 2012	Identificar el potencial de las bacterias hidrocarbonoclasticas aisladas para su uso en la remediación de sitios contaminados en 7 hidrocarburos diferentes	Australia Muestras de suelo contaminado de una las cercanías de una refinería	Generos bacterianos encontrados : Gamaproteobacterias Alfaproteobacterias Bacilos Flavobacterias Actinobacterias	La degradación de hidrocarburos, estuvo en función del genero bacteriano, y la concentración de hidrocarburo utilizado para el ensayo.	Laboratorio 8 días
Mahjoubi <i>et al.</i> , 2013	Bacterias hidrocarbonoclastas aisladas de sitios contaminados con hidrocarburos en Tunisia: aislamiento, caracterización y potencial biotecnológico	Túnez Sedimentos y agua de mar cercanos a una costa, donde se encuentra una refinería de aceites.	Generos bacterianos encontrados : <i>Acinetobacter</i> <i>Ochrobactrum</i> <i>Stenotrophomonas</i> <i>Novosphingobium</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Bacillus</i> <i>Brevundimonas</i> <i>Achromobacter</i> <i>Kocuria</i> <i>Microbacterium</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Agrobacterium</i> <i>Luteibacter</i> Generos bacterianos	Se realizó la medición de la producción de biosurfactates y emulsificación por parte de las bacterias hidrocarbonoclastas	Laboratorio 21 días
Brito <i>et al.</i> , 2015	Impacto de hidrocarburos, bifenilos policlorados y metales pesados en comunidades bacterianas en el río Lerma, Salamanca, México: investigación de la potencial degradación de hidrocarburos	Guanajuato Muestras del río Lerma, el cual se encuentra cerca de una planta termoeléctrica y donde llegan descargas de la refinería de aceite.	encontrados : <i>Pseudomonas</i> <i>Mycobacterium</i> <i>Aeromonas</i> Consortio dominado por el género <i>Pseudomonas</i>	Naftaleno fue completamente degradado, pireno y fluoranteno potencialmente degradados. (55.72 y 57 % respectivamente)	Laboratorio 21 días

2.6. JUSTIFICACIÓN

La presente investigación se realizará debido a la necesidad de promover la aplicación de la biorremediación al ser una técnica natural y de bajo costo para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos en el estado de Nuevo León. Todo esto en conformidad del cuidado ambiental establecido en la declaración del milenio de la ONU, el Plan Nacional de Desarrollo y el Plan de Desarrollo del Estado de Nuevo León, por lo que se destaca la importancia de la presente investigación, ya que busca convertirse en una opción que contribuya a la recuperación de los suelos de la región.

2.7. HIPÓTESIS

Consortios bacterianos hidrocarbonoclastas aislados de chapopoterías tienen la capacidad de degradar hidrocarburos totales del petróleo en suelos contaminados con hidrocarburos en la zona metropolitana de Monterrey.

2.8. OBJETIVOS

2.8.1. Objetivo General

Evaluar la capacidad de consorcios bacterianos hidrocarbonoclastas de aislados de afloramientos naturales de petróleo para biodegradar hidrocarburos totales del petróleo en suelos contaminados, utilizando la técnica de bioaumentación.

2.8.2 Objetivos Específicos

1. Aislar consorcios bacterianos hidrocarbonoclastas de muestras de suelos y rizósfera procedentes de chapopoterías ubicadas en el norte de Veracruz por medio de cultivo selectivo.
2. Aislar consorcios bacterianos de muestras de suelo expuestas con anterioridad a un contaminante externo de la Zona Metropolitana de Monterrey, para evaluar su capacidad de adaptarse a un medio más adverso con petróleo a diferentes concentraciones por medio de cultivo selectivo.
3. Caracterización fenotípica para la identificación de los grupos bacterianos más abundantes en el consorcio hidrocarbonoclasta seleccionado .

4. Realización de una prueba de biorremediación mediante la evaluación del potencial biotecnológico de los consorcios seleccionados para degradar hidrocarburos totales en suelos de talleres/estaciones de servicio de la ZMM.
5. Evaluación de la toxicidad causada por remanentes contaminantes en el suelo mediante un bioensayo utilizando plantas de *Phaseolus vulgaris*.
6. Análisis del ciclo de vida del proceso de biorremediación propuesto.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Consorcio bacteriano hidrocarbonoclasta

3.1.1 Muestreo para el aislamiento de consorcio procedente de Veracruz

El consorcio bacteriano hidrocarbonoclasta utilizado en este estudio fue obtenido a partir de un afloramiento natural de petróleo ubicado en el estado de Veracruz, específicamente de la comunidad llamada Zacamixtle la cual se localiza a 10 km del municipio de Tancoco, el cual se encuentra ubicado en la zona norte del estado de Veracruz, sobre la sierra de Otontepec, en las coordenadas 21° 17' latitud norte y 97° 47' longitud oeste, a una altura de 220 metros sobre el nivel del mar. Limita al norte con Tamalín y Naranjos Amatlán, al este con Tamiahua, al sur con Cerro Azul y Tepetzintla, al oeste con Chontla y Citlaltépetl (INAFED, 2015). Del sitio seleccionado se tomaron muestras representativas de suelo que contenían gran cantidad de petróleo (chapopoterías) en Septiembre del 2014, con una profundidad aproximada de 20 cm, las cuales se preservaron bajo condiciones semejantes de humedad y temperatura; para su posterior traslado al Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales (LICA), ubicado en la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL, en San Nicolás de los Garza,, Nuevo León, México, donde se desarrolló la parte experimental.

3.1.2. Aislamiento en agar nutritivo

Se tomaron muestras de 10 g de suelo las cuales se colocaron en matraces 10 mL de agua estéril, se sometieron a agitación constante de 200 rpm durante 5 min. Posteriormente se tomó 1 mL del sobrenadante para ser transferido en tubos de ensaye con 9 mL de solución salina, y realizar diluciones de 1:10 hasta 1:100000 para finalmente tomar 100 μ L de cada una de las respectivas

diluciones y sembrar en placas de agar nutritivo a 37 °C por 48 horas, el cual contenía pluripeptona y extracto de carne como fuente de carbono, nitrógeno que aportaban nutrientes para el desarrollo bacteriano, se siguió la metodología

descrita por Llenque (2011). El agregado de cloruro de sodio mantuvo el balance osmótico. La finalidad de crecer las bacterias en una fuente simple de carbono fue comprobar su comportamiento contra una fuente de carbono difícil de asimilar como lo son hidrocarburos.

Se seleccionaron las colonias más representativas de cada una de las diluciones y se identificaron por medio de tinción Gram.

3.1.3 Crecimiento en medio selectivo de cultivo Bushnell Haas

El consorcio aislado se transfirió al medio de cultivo Bushnell Haas siguiendo las especificaciones para la elaboración del medio de Mahjoubi *et al.*, (2013), este medio se caracteriza por proveer de todos los nutrientes que requieren los microorganismos para su crecimiento excepto la fuente de carbono; el sulfato de magnesio, cloruro de calcio y cloruro férrico proporcionan oligoelementos importantes para el crecimiento, los fosfatos de potasio actúan como buffers y el nitrato de amonio es la fuente de nitrógeno.

La composición del medio fue la siguiente: KH_2PO_4 (1g/L), K_2HPO_4 (0.2g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2g/L), CaCl_2 (0.02g/L), NH_4NO_3 (1g/L), y 2 gotas de FeCl_3 al 60%, a un pH 7. La fuente de carbono fue petróleo (4g/L), y se implementó aireación para la oxigenación del consorcio con una intensidad de flujo de 9.6 cm^3 por minuto.

3.1.4 Conservación del consorcio en placas de agar petróleo.

Para la conservación del consorcio en un medio sólido con una fuente de carbono compleja se utilizó agar petróleo: KH_2PO_4 (1g/L), K_2HPO_4 (0.2g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2g/L), CaCl_2 (0.02g/L), NH_4NO_3 (1g/L), 2 gotas de FeCl_3 al 60%, a un pH 7. La fuente de carbono fue petróleo (4g/L), y agar-agar (15g/L) para la solidificación del medio y posterior vertido en placas.

3.2 Aislamiento de rizobacterias

Las raíces de la planta procedentes de las muestras de suelo que contenían afloramientos naturales de hidrocarburos, fueron extraídas en su totalidad junto con el suelo circundante, sin ocasionar daños mecánicos.

Se pesó 1 g de las raíces, se realizaron varios lavados superficiales para eliminar el exceso de suelo con agua destilada; una vez realizados los lavados se colocaron en tubos con 10 mL de solución estéril de NaCl al 0.89% y se sometieron a centrifugación a 200 rpm durante 30 minutos.

La suspensión obtenida constituyó una dilución 1/10, a partir de la cual se realizaron diluciones hasta 1×10^{-6} (Reyes *et al.*, 2002; Peña y Reyes., 2007).

3.3 Aislamiento de consorcio de la zona metropolitana de Monterrey

Un segundo grupo de consorcios bacterianos fueron obtenidos de un sitio urbano céntrico en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, México. Ubicado entre las Ave. Guerrero y Progreso a una latitud de $25^{\circ}41'35.03''$ y una longitud de

$100^{\circ}180'33.88''$ O. El lugar de muestreo comprendió 3 zonas, las cuales que se caracterizaron por ser pertenecientes a una empresa dedicada a la fundición y

refinamiento de metales tales como: Ca, Bi, Pb, Co Zn y Cd. En la imagen se muestran las zonas que van de 1 a 3 la primera de ellas con un tamaño de 35m^2 , 48m^2 y 36m^2 respectivamente.



Figura 6. Sitio de muestreo del suelo en la Zona Metropolitana

de Monterrey.

3.3.1 Aclimatación de las muestras de suelo de la ZMM con petróleo

El petróleo crudo para la aclimatación de las muestras de suelo, fue proporcionado por una refinería, del sur del país aproximadamente 20 L.

Se tomaron submuestras de 200 g de suelo y se aplicaron 3 tratamientos por triplicado bajo diferentes concentraciones de petróleo crudo: 10% , 25% y 50% (porcentaje en base a peso seco). De igual forma se colocaron controles de suelo sin petróleo, petróleo solo y suelo estéril, para asegurar que el consorcio obtenido contara solo con microorganismos capaces de desarrollarse bajo estas condiciones como se describen la siguiente tabla.

*Nota : el suelo estéril como control se sometió a 3 ciclos de esterilización a 121 °C a 15 psi durante 15 minutos.

Tabla 5. Descripción de los tratamientos realizados por triplicado para la aclimatación del suelo con posibles bacterias degradadoras de hidrocarburos.

Tratamientos de suelo	% de petróleo en suelo	Controles
Tratamiento 1	10% de petróleo	Suelo sin petróleo
Tratamiento 2	25 % de petróleo	Petróleo
Tratamiento 3	50% de petróleo	Suelo estéril (3 ciclos de esterilización)

Tras realizarse la incorporación al suelo del hidrocarburo, se colocaron las muestras en frascos de plástico con capacidad de 1 L que permitieran el paso del oxígeno y se sometieron a incubación a una temperatura de 37 °C por un periodo de tiempo de 60 días cuidando que la humedad del suelo se mantuviera en un 70%, para el desarrollo adecuado de la microbiota. Transcurrido este lapso de tiempo, se procedió a realizar el aislamiento del consorcio capaz de desarrollarse bajo estas condiciones.

3.3.2 Aislamiento de consorcio aclimatado con muestras de petróleo en agar nutritivo

Se tomaron muestras de 10 g de suelo las cuales se colocaron en matraces de 125mL con 10mL de agua estéril, se sometieron a agitación constante de 200 rpm durante 5 min. Posteriormente se tomó 1 mL del sobrenadante para ser transferido en tubos de ensaye con 9 mL de solución salina, y realizar diluciones de 1:10 hasta 1:100000 para finalmente tomar 100 μ L de cada una de las

respectivas diluciones y sembrar en placas de agar nutritivo a 37 °C por 48 h, el cual contenía pluripeptona y extracto de carne como fuente de carbono y nitrógeno.

*Nota: el proceso de esterilización consintió en llevar el autoclave a 121 °C con 15 psi de presión, durante 15 minutos .

En esta etapa se seleccionaron las colonias más representativas de cada una de las diluciones y se identificaron por medio de tinción Gram.

3.3.3 Crecimiento en medio selectivo de cultivo Bushnell Haas

El consorcio aislado se transfirió al medio de cultivo Bushnell Haas, la composición del medio es descrita en la sección 3.1.3, este medio se caracteriza por proveer de todos los nutrientes que requieren los microorganismos para su crecimiento excepto la fuente de carbono; el sulfato de magnesio, cloruro de calcio y cloruro férrico proporcionan oligoelementos importantes para el crecimiento, los fosfatos de potasio actúan como buffers y el nitrato de amonio es la fuente de nitrógeno.

La fuente de carbono fue petróleo (4g/L), y se implementó aireación para la oxigenación del consorcio con una intensidad de flujo de 9.6 cm³ por minuto.

3.3.4 Conservación del consorcio en placas de Agar petróleo.

Para la conservación del consorcio en un medio solido con una fuente de carbono compleja se realizó agar petróleo: en el cual se tomó como base la formulación del medio mineral Bushnell Haas, descrito en la sección 3.1.3 y se adiciono la fuente de carbono petróleo (4 g/L), y agar-agar (15 g/L) para la solidificación del medio y posterior vertido en placas.

3.4 Caracterización del suelo de estudio

Los parámetros físico químicos determinados en las muestras de suelo se presentan en le tabla 6. Los análisis correspondientes se realizaron por triplicado.

Tabla 6. Parámetros físicos y químicos analizados en el suelo estudiando y los métodos seguidos para su determinación.

Prueba	Método
Densidad	NOM-021-SEMARNAT-2000,método AS-03
Humedad	NOM-021-SEMARNAT-2000,método AS-05
Materia orgánica	NOM-021-SEMARNAT-2000,método AS-07
pH	NOM-021-SEMARNAT-2000, método AS-02
Textura	NOM-021 SEMARNAT-2000, método AS-09
Capacidad de campo	NOM-021-SEMARNAT-2000, método AS-04

3.4.1 Determinación de la densidad

La densidad aparente de las muestras de suelo fue calculada de acuerdo a la norma NOM-021-SEMARNAT-2000, método AS-03 a partir del conocimiento de dos parámetros: la masa del suelo y el volumen total, es decir el volumen de los sólidos y el volumen ocupado por el espacio poroso. La masa se determinó pesando la muestra (terrón) y el volumen de manera indirecta recubriendo el terrón con una capa de parafina y pesándolo sumergido en un líquido (agua) como se describe a continuación.

Se secó el suelo en la estufa a 105 °C hasta peso constante, se tomaron terrones de la muestra de estudio con un diámetro máximo de 2 cm; a uno de estos terrones se ató un hilo para pesarlo en la balanza cuidando que el otro extremo permitiera sujetarlo mientras se pesaba en la balanza siendo este el peso del terrón al aire (Pt)a.

Este terrón se sumergió en parafina a punto de fusión, cuidando que quedara totalmente cubierto; este fue el peso parafinado al aire (Ptp)a. Finalmente este se sumergió en una probeta con 500mL de agua al interior de la balanza para registrar únicamente el peso del terrón sumergido en el agua, el cual fue (Ptp)W. Los cálculos se muestra en el a Eq (1).

$$(P_t - P_{tp}) = \rho_{H_2O} (V_t + V_p) \quad (1)$$

$$P_t - P_{tp} =$$

$$=$$

$$(P_t + P_{tp}) -$$

$$= \text{Densidad de } H_2O$$

$$= \text{Densidad de la parafina (0.90 g/cm}^3\text{)}$$

Para la obtención de datos lo más certero posibles se usó el siguiente cuadro de equivalencias para la corrección del valor de la densidad por el efecto de la temperatura (Tabla 7 y 8).

Tabla 7. Relación de la temperatura con la densidad del agua.

Temperatura (°C)	Densidad del agua (g/cm³)
10	0.99970
12	0.99950
14	0.99924
16	0.99894
18	0.99860
20	0.99820
22	0.99770
24	0.99730
26	0.99678
28	0.99623
30	0.99565
32	0.99503
34	0.99437
36	0.99369

Tabla 8. Interpretación de resultados

Tipos de suelos	g/cm³
Orgánicos y volcánicos	Menor de 1.00
Minerales	1.0 -1.19
Arcillosos	
Francosos	1.20 -1.32
Arenosos	Mayor a 1.32

3.4.2 Determinación de humedad

El método se basó en la determinación del contenido de humedad de la muestra de manera indirecta de acuerdo a la NOM-021-SEMARNAT-2000, método AS-05.

Se tararon crisoles a 100 °C. Se pesaron 5 g de suelo y se llevaron a la estufa a 100 °C por un espacio de 24 horas. Se dejaron enfriar en un desecador con sílica gel por 30 minutos y se llevaron a peso constante. Se registraron los pesos. Se utilizó la ecuación 2.

Para la determinación del porcentaje de humedad las muestras.

$$\% = \frac{M1-M2}{M} * 100 \quad (2)$$

Dónde:

M1 = peso del crisol más la muestra húmeda

M2 = Peso del crisol más muestra seca

M= Peso de la muestra sola

3.4.3 Determinación de pH

Se pesaron por separado 1 gr de suelo seco, de la muestra por triplicado y se colocaron en vasos de precipitado de 250 mL que contenían 25 mL de agua desionizada. Se colocaron en un Shaker a temperatura ambiente a 50 rpm durante 30 minutos. Se calibró el potenciómetro con las soluciones reguladoras de pH de 4, 7 y 10, se tomaron las lecturas de pH de la solución del suelo.

3.4.4 Determinación de materia orgánica (MO)

En primer lugar se llevó a cabo la tara de crisoles a una temperatura de 100 °C. En cada crisol se pesaron 5 g de suelo seco por triplicado, y se colocaron en una plancha de calentamiento hasta que las muestras dejaran de emitir vapores. Posteriormente se introdujeron las muestras a la mufla a 360 °C por 8 horas, se dejaron enfriar en un desecador y se registraron los pesos (Eq. 3).

$$\% \text{ á } = \left[\frac{P1 - P2}{P2 - C1} \right] * 100 \quad (3)$$

Dónde:

P1= Peso del suelo antes de la calcinación

P2= Peso del suelo después de la calcinación

C1 = peso del crisol

3.4.5 Determinación de capacidad de campo (CC)

Se tomaron 100 g de suelo por triplicado, previamente secado a 105°C por un periodo de 24 h. Se colocaron en matraces Erlenmeyer con embudos en la parte superior que contenían papel filtro para posteriormente agregar agua hasta saturación al observar las primeras gotas de agua se aseguró cubrir totalmente el diámetro del embudo con papel parafilm para evitar la evaporación del agua, después de las 24 h se midió la cantidad de agua gastada (Eq. 4).

$$() = h - \quad (4)$$

Dónde :

CC = Contenido de humedad a cc o pmp.

Psh = Peso del suelo húmedo.

Pss = Peso del suelo seco.

4. Diseño Experimental: prueba de biorremediación de un suelo de la ZMM

4.1 Tratamientos

El suelo problema fue obtenido de un taller automotriz de la zona de San Nicolás de los Garza, Nuevo León; la ubicación se reserva puesto que el dueño para acceder a proporcionar la muestra pidió privacidad.

Se realizó el experimento con diferentes tratamientos para evaluar la atenuación natural, bioestimulación y la bioaumentación como técnicas de biorremediación, en un suelo contaminado proveniente de un sitio que se caracteriza por poseer elevadas concentraciones de HTP visibles ya que con el paso de los años los derrames de aceite para motor, gasolina, y otro tipo de aditamentos que contienen hidrocarburos en su formulación han estado impactando dicho lugar.

El estudio consistió en preparar 12 tratamientos con 1.700 kg de suelo cada uno y realizar mediciones de HTP durante los días 1, 4, 7, 14, 21, y 30 cada uno. Los recipientes utilizados contaron con capacidad para 4.6 L y se mantuvieron bajo condiciones controladas de humedad entre el 70 % y 80 % cubiertos y rotulados para evitar contaminaciones cruzadas entre los tratamientos de bioestimulación y bioaumentación. Como reactores se utilizaron palanganas plásticas de 40 x20 x 12 cm (largo, ancho y alto respectivamente). Se mantuvo la humedad cercana al 80 % de capacidad de campo durante todo el experimento aplicando el agua necesaria cada 3er día. Los reactores se cubrieron (no herméticamente) con su respectiva tapa para minimizar evaporación. Los reactores con zacate se taparon con un plástico transparente para permitir ingreso de luz.

Los tratamientos aplicados se describen a continuación:

4.1.1 Bioaumentación

Al suelo contaminado con HTP se le adicionaron 5 mL el consorcio bacteriano hidrocarbonoclasta aislado del afloramiento natural de petróleo, descrito en la sección 7.2, con una concentración de 30,000 UFC por mL, la concentración fue obtenida por medio de cuenta viable en placa durante la fase exponencial de crecimiento de dicho consorcio.

Suelo contaminado + Consorcio hidrocarbonoclasta

Suelo contaminado + Consorcio hidrocarbonoclasta + Landfarming

El Landfarming se realizó 6 días por semana desde el día 1 hasta al día 30. El procedimiento consistió en mover el suelo con la ayuda de una espátula, asegurando su limpieza con etanol al 70 %, para promover la entrada de oxígeno en este, y mantener la humedad entre el 70 % y el 80 %.

Suelo contaminado + consorcio hidrocarbonoclasta + Bokashi

Se le adicionaron 3.3 gramos de Bokashi, esto en base a los reportes técnicos y artículos revisados, Suthamathy *et al.*, 2013 utilizaron 300 g por m²; Steven Leong en el 2011, sugiere las concentraciones a utilizar de Bokashi en base a la planta a sembrar, y estas varían de 300mg a 1g por m² de suelo. Las muestras de Bokashi fueron obtenidas de LICA y su composición se puede observar en la siguiente tabla.

Tabla 9. Composición del Bokashi.

Residuos	A Formula Base	B Aporte de material lignocelulosico	C carbohidratos libres de celulosa
Bagazo	1.5 kg	2 kg	1.5 kg
Frutas y Verduras	1.5 kg	1 kg	1 kg
Estiércol porcino	1.5 kg	1 kg	2 kg
Aserrín	0.25 kg	0.25	0.25 kg
Ceniza	0.25 kg	0.25	0.25 kg
Residuo de levadura	400 mL	400 mL	400mL

Fuente: Candelario Torres, 2015

Suelo contaminado + consorcio hidrocarbonoclasta + Biofertilizante

Se adicionaron 2 g de biofertilizante con la siguiente composición: humedad 12.42 %, nitrógeno Kjeldahl 2.52 %, lípidos 0.19 %, cenizas 31.56 % .

Suelo contaminado + consorcio hidrocarbonoclasta + microalga

Se adicionaron 3 g de microalga deshidratada ya que según Faheed y Abd en el 2008, probaron a *Chlorella vulgaris* como Biofertilizante para el crecimiento de lechuga adicionando de 2 a 3 gr de alga seca por cada Kg de suelo a tratar, Popescu y Popescu en el 2014, emplearon *Ascophyllum nodosum* como biofertilizante para el crecimiento de las uvas en la elaboración de vino.

Suelo contaminado + consorcio hidrocarbonoclasta + Zacate

Las semillas de *Cynodon dactylon* zacate bermuda variación Sahara fueron pre-germinadas en una placa petri con una base de papel filtro, esto con la finalidad de ayudar a su posterior germinación en el suelo contaminado.

Se le proporcionaron foto periodos de 12 horas luz, 12 horas oscuridad y se regaron para mantener la humedad del suelo entre el 70% y el 80 %.

4.1.2 Bioestimulación

Se manejaron las mismas concentraciones de los anteriores tratamientos, solo se eliminó el consorcio quedando de la siguiente manera:

Atenuación natural Asistida

Suelo + Landfarming

Suelo + Bokashi

Suelo + Biofertilizante

Suelo + Alga

Suelo + Zacate

5. Extracción de hidrocarburos

5.1 Método agitación-centrifugación

Esta técnica se basó en los métodos 3500B Y 3540C de la EPA (1996) y el reportado por Schawb *et al.* (1999), con algunas modificaciones de Arce *et al.*, (2004) en cuanto a la velocidad de agitación y volúmenes de solvente para utilizar. Las pruebas se realizaron por triplicado en base a la norma oficial mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000.

El método se basa en la extracción de los hidrocarburos del petróleo no volátiles y semi-volátiles de muestras sólidas (suelo) a través del contacto íntimo de la muestra con solvente, mediante la agitación de en un tubo (lavado), produciendo un efecto de extracciones sucesivas, y separando posteriormente el solvente del suelo por centrifugación.

1.-Se pesaron 2 g de suelo seco, previamente triturado en un tubo de 50 mL para centrifuga, se adicionaron 3 g. Na_2SO_4 anhidro, y se mezclaron en vórtex hasta homogeneizar.

*Nota: el Sulfato de sodio debe secarse previamente en el horno por 4 horas a una temperatura de 120°C

2.- Se adicionaron 5 mL de CH_2Cl_2 grado HPLC y se volvió a agitar en vórtex por 45 s. Posteriormente, se centrifugó a 4600 rpm por 20 min. Se retiró el sobrenadante y colocó en un matraz bola.

4.- El suelo se lavó en 2 ocasiones más hasta obtener aprox. 15 mL de sobrenadante (extracto orgánico).

5.- Una vez que el extracto orgánico fue obtenido (método anterior) este en un matraz bola se procedió a la evaporación total del solvente CH_2Cl_2 en un rotoevaporador 740+-50 mbar y 45°C hasta sequedad.

6.- Se pesó nuevamente el matraz, con el extracto libre de solvente (ya concentrado) y se tomó el peso (Rb).

Cálculos

La diferencia del peso corresponde al contenido total de HTPS.

Para hacer el cálculo de concentración de hidrocarburos totales del petróleo proveniente de la muestra, se consideró la cantidad de suelo que se pesó para la extracción, así como la humedad de la muestra.

El resultado se expresó en mg de HTP/kg de suelo seco, y se calculó de la siguiente manera (Eq. 5) :

$$\text{Dónde: } \left(\text{mg kg}^{-1} \text{ de s.s.} \right) = \left(\text{Ra} - \text{Rb} \right) * \left(\text{P} \right) / \left(\text{FH} * \text{FC} \right) \quad (5)$$

HTP (mg kg⁻¹ de s.s) = Hidrocarburos totales del petróleo en mg/kg de suelo seco.

Ra= Peso (mg) de recipiente vacío a peso constante

Rb= Peso (mg) de recipiente con el extracto orgánico concentrado

P= Cantidad de suelo extraído

FH= Factor de corrección de humedad (1-(%humedad/100))

FC= Factor de corrección para transformar a kg de s.s=1000

5.1.2 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de la concentración final de mg/kg de HTP se realizaron por triplicado, efectuándose un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) y un análisis multivariante de la varianza (MANOVA), para los datos que presentaron diferencia significativa se llevó a cabo una comparación múltiple de medias por el método de HSD Tukey ($\alpha = 0.5$) utilizando el programa

estadístico SPSS (versión 22.0 para Windows, SPSS Inc., Chicago Illinois, USA).

6. Bioensayo de toxicidad

Se realizó una prueba para evaluar la respuesta fisiológica de *Phaseolus vulgaris* (frijol) ante los HTP de los tratamientos anteriormente indicados (sección 4.1), exceptuando los 2 tratamientos con zacate, y adicionando un suelo testigo que no fue expuesto a los contaminantes del petróleo.

Las variables a considerar durante el bioensayo fueron: emergencia, altura, número de hojas, longitud, el tiempo del análisis fue de 15 días.

Las semillas fueron pre-germinadas durante 8 horas, para posteriormente sembrar en el suelo en el que se trazaron 4 carriles y se sembraron 10 semillas en cada uno de ellos los tratamientos se sometieron a 12 horas continuas de luz y 12 horas de oscuridad, además del riego diario para asegurar el crecimiento óptimo de las plantas.

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 Análisis físico y químico de los parámetros del suelo

7.1.2 elo procedente de Veracruz

Con la finalidad de conocer las principales características de los suelos de estudio, se determinaron los parámetros necesarios para iniciar el desarrollo experimental, esto en base a la norma oficial mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000, ya que de acuerdo con los de Eweis *et al.* (1999) existen parámetros del suelo recomendables para la acción de la biodegradación, tales como el pH del suelo entre 7.21 y 7.90, la temperatura ambiente entre 22°C y 40°C, la humedad relativa entre 20% y 98%, además de la humedad del suelo entre 14.90% y 31.83%.

En la siguiente tabla se muestran los parámetros analizados así como los resultados obtenidos en base a las especificaciones de la norma y el método establecido.

Resultados similares fueron reportados por Morales (2014), en suelo con características afines al sitio de aislamiento y perteneciente al estado de Veracruz. En dicho estudio además se cuantificaron otros parámetros del suelo que permitieron determinar su productividad para un futuro empleo en la

Tabla 10. Resultados del análisis del análisis físico y químico del suelo de Veracruz.
labranza, fertilización, riego y drenaje.

Prueba	Resultado	Método
Densidad	1.36±0.01	NOM-021-SEMARNAT-2000,método AS-03
Humedad	35.07±1.83	NOM-021-SEMARNAT-2000,método AS-05
pH	6.49±0.05	NOM-021-SEMARNAT-2000,método AS-02
Materia orgánica	5.22±0.68	NOM-021-SEMARNAT-2000,método AS-07

n=3. Valor promedio ± E.E

7.1.3 Suelo procedente de la Zona Metropolitana de Monterrey contaminado con metales pesados.

La contaminación en suelos de zonas urbanas industriales proviene de una diversidad de fuentes. Los suelos pueden estar simultáneamente contaminados por metales pesados y por hidrocarburos. Debido a esto, la finalidad de trabajar con muestras de suelo de un sitio contaminado con metales pesados, fue evaluar la eficiencia de este tipo de bacterias metalófilas para sobrevivir, adaptarse, además de contribuir en los procesos de biodegradación una vez que son capaces de desarrollarse bajo condiciones adversas, por la presencia de un contaminante. Se ha demostrado que en presencia de contaminantes en particular los metales pesados, las bacterias producen tensoactivos, que pueden provocar la emulsificación de productos químicos hidrófobos, en particular los hidrocarburos (Dávis *et al.*, 2014). Esto también quedó demostrado por Mulligan *et al.* (1999) y Jayabarath *et al.* (2009), en cuyos estudios evidencian que los tensoactivos promueven la eliminación del contaminante.

En las Tablas 11 y 12 se muestran los resultados obtenidos y reportados por un estudio previo realizado en el LICA por Cárdenas (2010), los cuales fueron tomados como punto de partida para las pruebas de aclimatación con las diferentes concentraciones de petróleo.

Tabla 11. Concentración de metales pesados tomando de Cárdenas (2010).

Zona de muestreo	Concentración de Metales		(mg/Kg)
	Ni	Pb	Zn
1	0.69 ± 0.51	78.8 ± 2.4	6341 ± 345
2	DL	59.0 ± 4.53	4464 ± 202
3	3.12 ± 0.97	153 ± 3.81	5113 ± 140

DL: debajo del límite de detección, resultados promedio (n=6 ±: error estándar)

Tabla 12. Parámetros del suelo contaminado con metales pesados tomado de Cárdenas (2010).

Zona de muestreo	Textura	pH	%Materia orgánica	%Capacidad de campo	%Humedad
1	FAR	7.94± 0.02	7.60± 0.20	56.1± 0.80	6.53± 0.30
2	FAR	7.87± 0.01	11.1± 0.10	73.0± 0.60	4.67± 0.40
3	F	7.66± 0.00	24.0± 0.10	60.0± 1.50	3.12± 0.50
Recomendable	-----	6.60± 7.30	>1.60	30.0-40.0	6.00± 8.00

Resultados promedio (n=2 ± error estándar), FAR franco arcilloso, F: franco, según la NOM-147.

7.1.4 Suelo procedente de la Zona Metropolitana de Monterrey con alta contaminación visible por hidrocarburos del petróleo.

El suelo de estudio descrito a detalle en la sección 4.1 que fue utilizado para las pruebas posteriores de bioestimulación y bioaumentación, los análisis realizados arrojaron los siguientes resultados descritos en la Tabla 13 es importante destacar que el suelo de estudio es una muestra real también denominado “ pasivo ambiental ” . Dicha muestra se tomó del patio de un taller automotriz

localizado en el municipio de San Nicolás de los Garza, NL, cuya operación fue iniciada en el año 1987.

Un pasivo ambiental según la SEMARNAT (2015), es un sitio contaminado por la liberación de materiales o residuos peligrosos que no fueron remediados oportunamente, para impedir la dispersión del contaminante, pero que implica una obligación de remediación.

En la Figura 7 podemos observar la muestra de pasivo ambiental, en la que es visible el color sumamente oscuro por la acción de los HTP que han sido derramados, además de poseer un fuerte olor a combustible y una textura al tacto sumamente difícil de manejar.



Figura 7. Muestra de suelo contaminada por la acción de los HTP (pasivo ambiental).

Tabla 13. Resultados obtenidos del análisis físico químico del suelo contaminado con HTP.

Prueba	Resultado	Método
Densidad	1.16 ± 0.03	NOM-021-SEMARNAT-2000,método AS-03
Humedad	5.43 ± 0.04	NOM-021-SEMARNAT-2000,método AS-05
pH	7.83 ± 0.12	NOM-021-SEMARNAT-2000,método AS-02
Materia orgánica	3.50 ± 0.21	NOM-021-SEMARNAT-2000,método AS-07

Resultados promedio ($n=3 \pm$ error estándar),

7.2 Consorcios bacterianos

7.2.1 Obtención del consorcio hidrocarbonoclasta

El aislamiento de consorcios nativos de un sitio con afloramientos naturales de petróleo se debió a su conocida adaptación a sobrevivir y crecer en presencia de elevadas concentraciones de hidrocarburos. A la fecha, la mayor parte de la investigación para fines de biorremediación de hidrocarburos se ha realizado utilizando consorcios aislados de suelos contaminados por hidrocarburos para garantizar que las bacterias tendrán una alta capacidad para su desarrollo bajo estas condiciones (Roy *et al.*, 2014), sin embargo pocos reportes existen sobre estudios similares utilizando BHCC's.

De las muestras de suelo provenientes de las chapopoteras se logró aislar un consorcio de bacterias y rizobacterias en conjunto obteniendo en total de 12 cepas.



Figura 8. Suelo proveniente de afloramiento natural de petróleo en el estado de Veracruz, México.

7.2.1 Colonias seleccionadas para su aislamiento

Una vez transcurrido el tiempo de incubación (24 horas 37°C) se procedió a realizar el aislamiento de las colonias más representativas, la mayoría de las colonias presentaron un difícil agarre por la formación de tensoactivos, muy común en bacterias con potencial para la degradación de hidrocarburos.

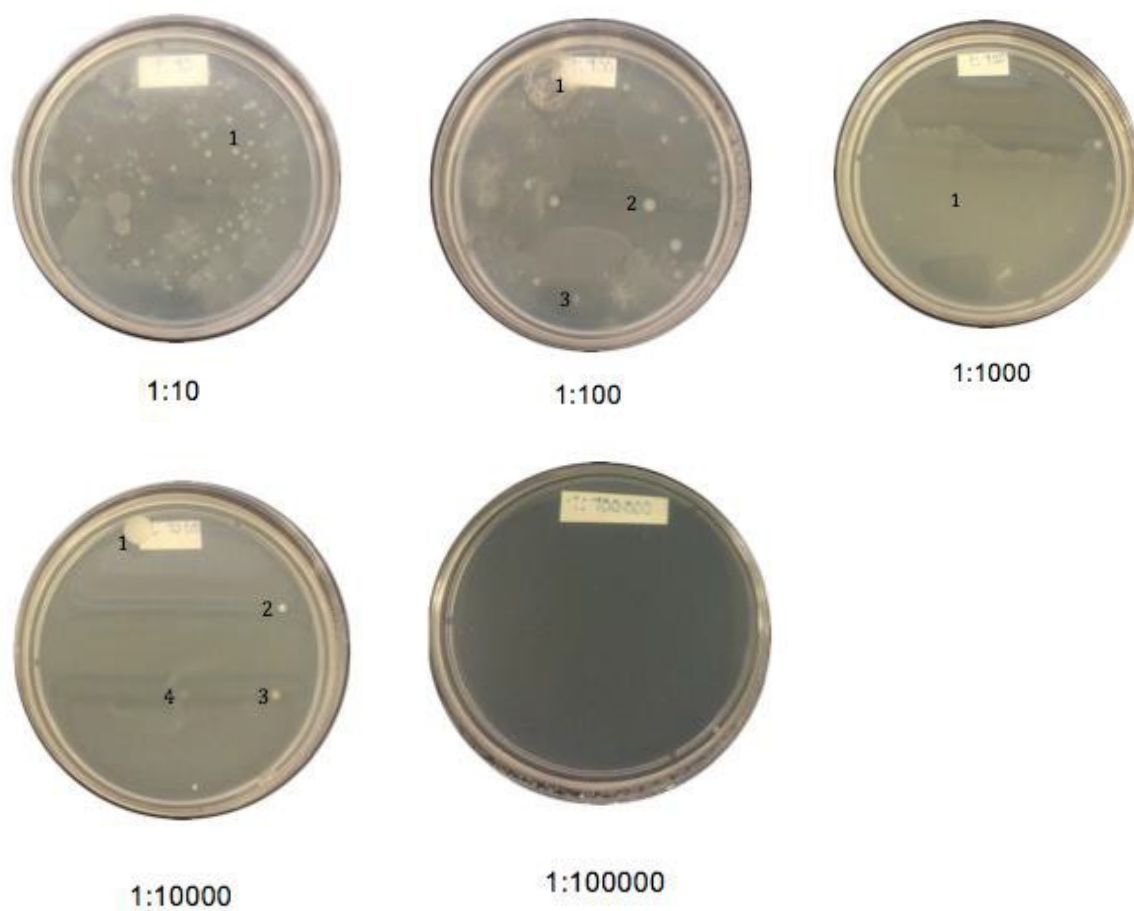


Figura 9. Diluciones de siembra por extensión en placa, el crecimiento y la morfología macroscópica.

7.2.3 Caracterización microscópica de las colonias seleccionadas

Dilución Número de colonias

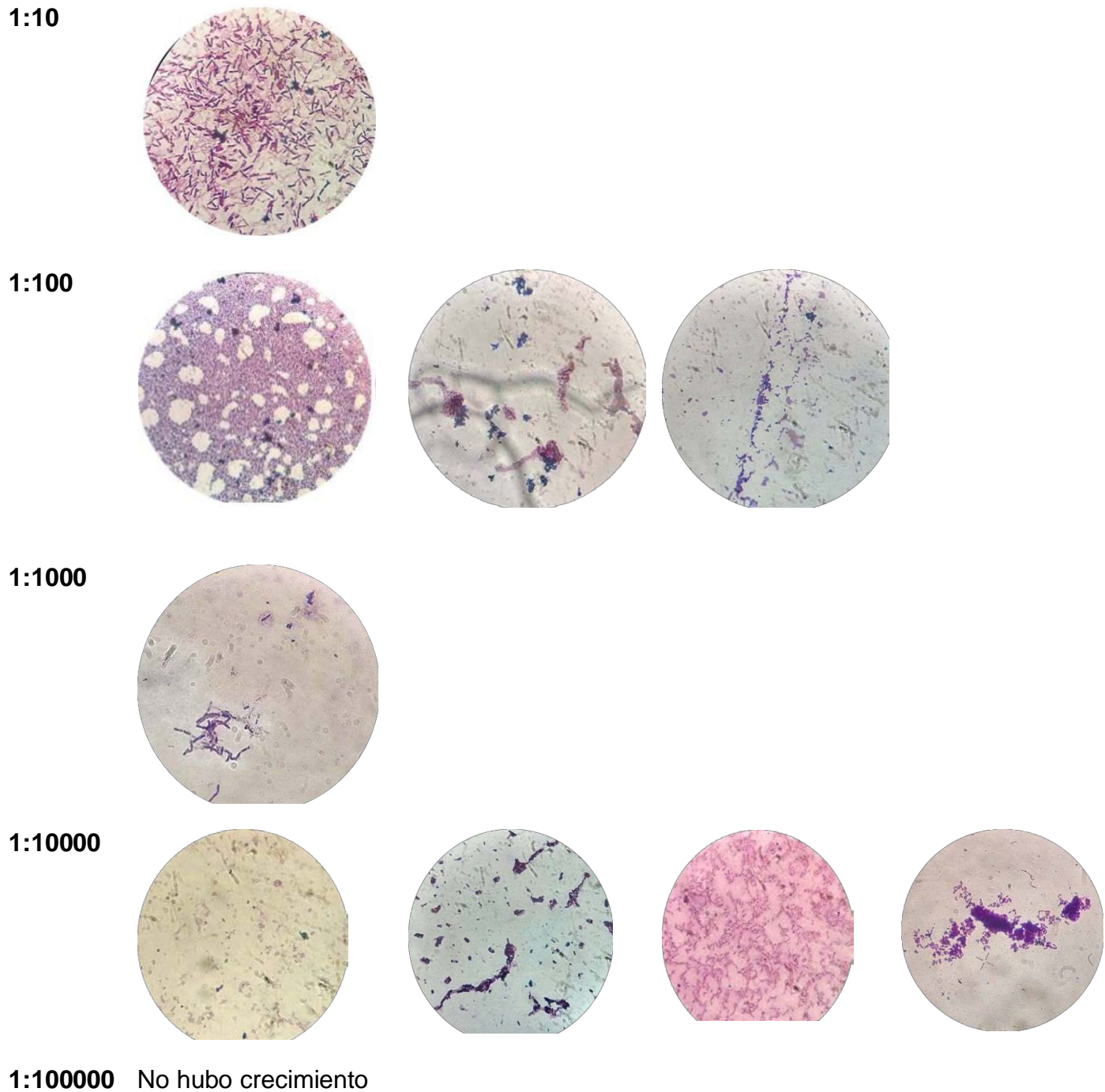


Figura 10. Caracterización Gram de cada una de las colonias seleccionadas

Tabla 14. Colonias aisladas del suelo proveniente de afloramiento natural de petróleo en el estado de Veracruz, México.

Dilución	Colonias seleccionadas y Gram	Características Macroscópicas	Morfología microscópica
1:10	1 Gram (+)	1. Blanca cremosa, brillante, pequeña, borde regular.	1. Bacilos no segmentados, menor tamaño.
1:100	1 Gram (+) 2 Gram (+) 3 Gram (+)	1. Colonia cremosa de gran tamaño, borde filamentosos, mucóide. 2. Colonia blanca, cremosa, brillante, borde regular. 3. Colonia beige, borde regular, brillante, cremosa.	1. Bacilos segmentados, esporulados en Cadenas. 2. Bacilos no segmentados, sin esporas. 3. Cocobacilos en racimos, y tétradas.
1:1000	1 Gram (+)	1. Colonia de gran tamaño, borde irregular, cremosa, brillante.	1. Bacilos segmentados, esporulados en cadenas.
1:10000	1 Gram (+) 2 Gram (+) 3 Gram (-) 4 Gram (+)	1. Blanca cremosa, mayor tamaño, borde regular, brillante. 2. Blanca pequeña, borde regular, ligeramente elevada. 3. Amarilla cremosa, pequeña, borde definido. 4. Naranja, brillante, cremosa, borde regular.	1. Bacilos no segmentados, no esporulados. 2. Bacilos en cadenas, esporas moderadas. 3. Bacilos no esporulados 4. Bacilos sin esporas.
1:100000	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento

Tabla 15.Colonias aisladas de rizósfera del suelo.

Dilución	Colonias seleccionadas y tinción Gram	Características macroscópicas	Morfología microscópica
1:100	1 Gram (+)	Colonia brillante en color nuez, redonda, borde regular, sin elevación.	Bacilos largos en cadenas
1:1000	1 Gram (+)	Colonia blanca, borde irregular, con elevación, no brillante y puntiforme.	Bacilos cortos segmentados
1:10000	1 Gram (-)	Colonia blanca, aspecto cremoso, brillante, borde irregular (mayor tamaño).	Bacilos de agrupación irregular

Colonias aisladas de la rizósfera

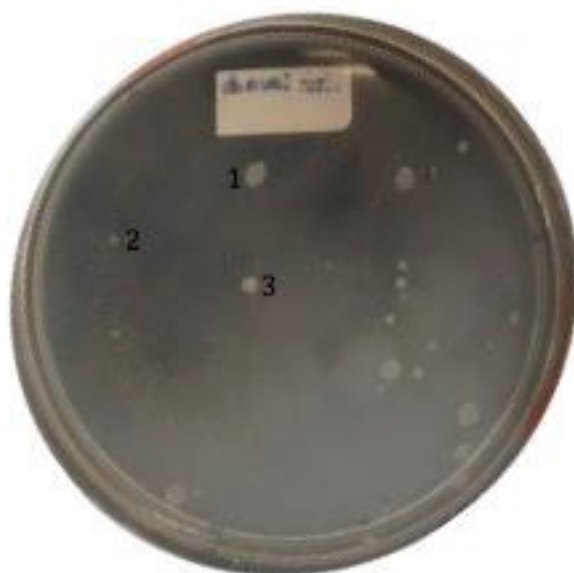


Figura 11. Colonias seleccionadas para su aislamiento.

7.2.4 Caracterización microscópica de aislados de rizobacterias

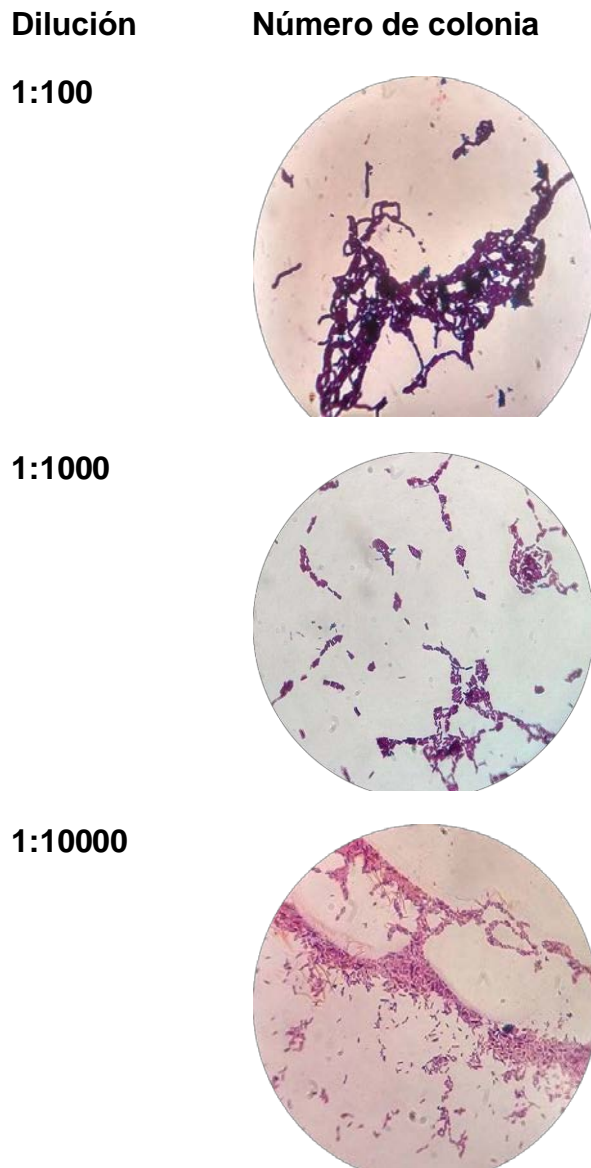


Figura 12. Caracterización Gram de cada una de las colonias seleccionadas

Las bacterias obtenidas de las muestras de suelo y raíz de las plantas pertenecientes al afloramiento natural de petróleo (chapopotera) muestran una tendencia similar a reportes anteriores en los que se demostró en su mayoría bacilos Gram+ y escasos Gram-, esto se debe a que son pocas las especies capaces de vivir con hidrocarburos como fuente de carbono, por tal motivo se da un aumento de la comunidad microbiana predominante y un decrecimiento en la diversidad (Zamora *et al.*, 2012; Llenque Díaz, 2011; Gargouri *et al.*, 2014).

7.3 Obtención del consorcio metalófilo tolerante a hidrocarburos

Las muestras de suelo de la zona metropolitana de Monterrey fueron aisladas de una zona que con anterioridad se dedicaba al refinamiento y fundición de metales, dado el giro industrial del predio, el suelo también se encontraba expuesto el derrame de cierto tipo de combustibles. Un análisis preliminar en dicho sitio encontró que los metales pesados por encima de los límites máximos permisibles (Tabla 10) que establece la norma oficial mexicana fueron: Ni, Pb y Zn (Cárdenas, 2010).

7.3.1 Pre- enriquecimiento

En esta etapa, se inició una adaptación del consorcio metalófilo al petróleo crudo como fuente de carbono y energía; los tratamientos aplicados (porcentaje en base a peso seco) fueron T1 (10 % de petróleo), T2 (25% de petróleo), T3 (50 % petróleo), suelo control (sin hidrocarburo) petróleo control (solo hidrocarburo), las condiciones específicas de experimentación se describe en la sección 3.3.1 de la sección de metodología.

La estrategia empleada para la aclimatación de los microorganismos en el estudio de investigación tiene relevancia ya que varios autores respaldan la teoría de someter los cultivos a exposiciones prolongadas con el contaminante, en su mayoría derivados del petróleo como gasolina, aceites, etc; coinciden que la selección de microorganismos a través de cultivos enriquecidos con petróleo, es considerada como una estrategia eficiente para evaluar la adaptación y supervivencia de cepas tolerantes a elevadas concentraciones de petróleo (Echeverri *et al.*, 2010; Mackey A. y Hodgkinson M., 1996). Los resultados obtenidos respaldan lo dicho por estos investigadores ya que se pudo observar que a una concentración baja de petróleo 10% los microorganismo capaces de sobrevivir, fueron menores que a una concentración del 25%, sin embargo a una concentración del 50% la población decrece aunque no considerablemente, además se observaron colonias con características muy diversificadas en cuanto a textura, color, y tamaño; ya que con la acción de los hidrocarburos se ven

modificados muchos de los parámetros fisicoquímicos del suelo tales como la capacidad de campo, el pH, intercambio gaseoso, distribución de humedad, el intercambio de iones, por mencionar algunos.

7.3.2. Aislamiento de consorcio metalófilo



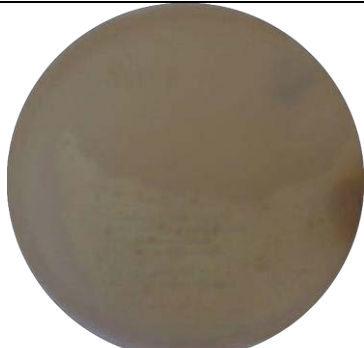
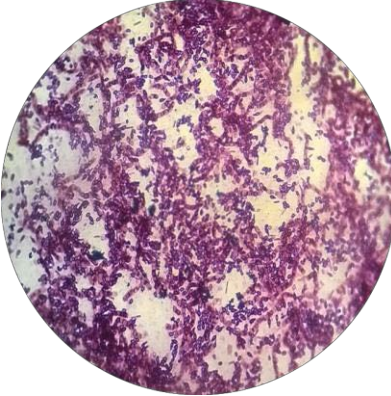
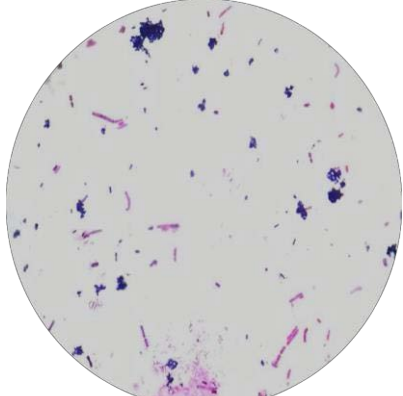
Suelo estéril	Suelo	Petróleo (1 g en 100 mL agua estéril)
		
Sin crecimiento	Colonias de aspecto seco, de gran tamaño.	Colonias amarillas, borde regular, cremosas, y colonias de aspecto transparente, brillantes de difícil agarre, mucoides.
		
	Bacilos gram (+) esporulados.	Bacilos rectos y curvos gram (-). Bacilos y cocobacilos gram (+).

Figura 13. Controles empleados para la obtención del consorcio

En las siguientes imágenes (figura 14) se muestran las siembras y aislados de los tratamientos pre-enriquecidos por 60 días con las diferentes concentraciones de petróleo crudo.

7.3.2.1 Colonias aisladas del tratamiento T1 (10% de petróleo)

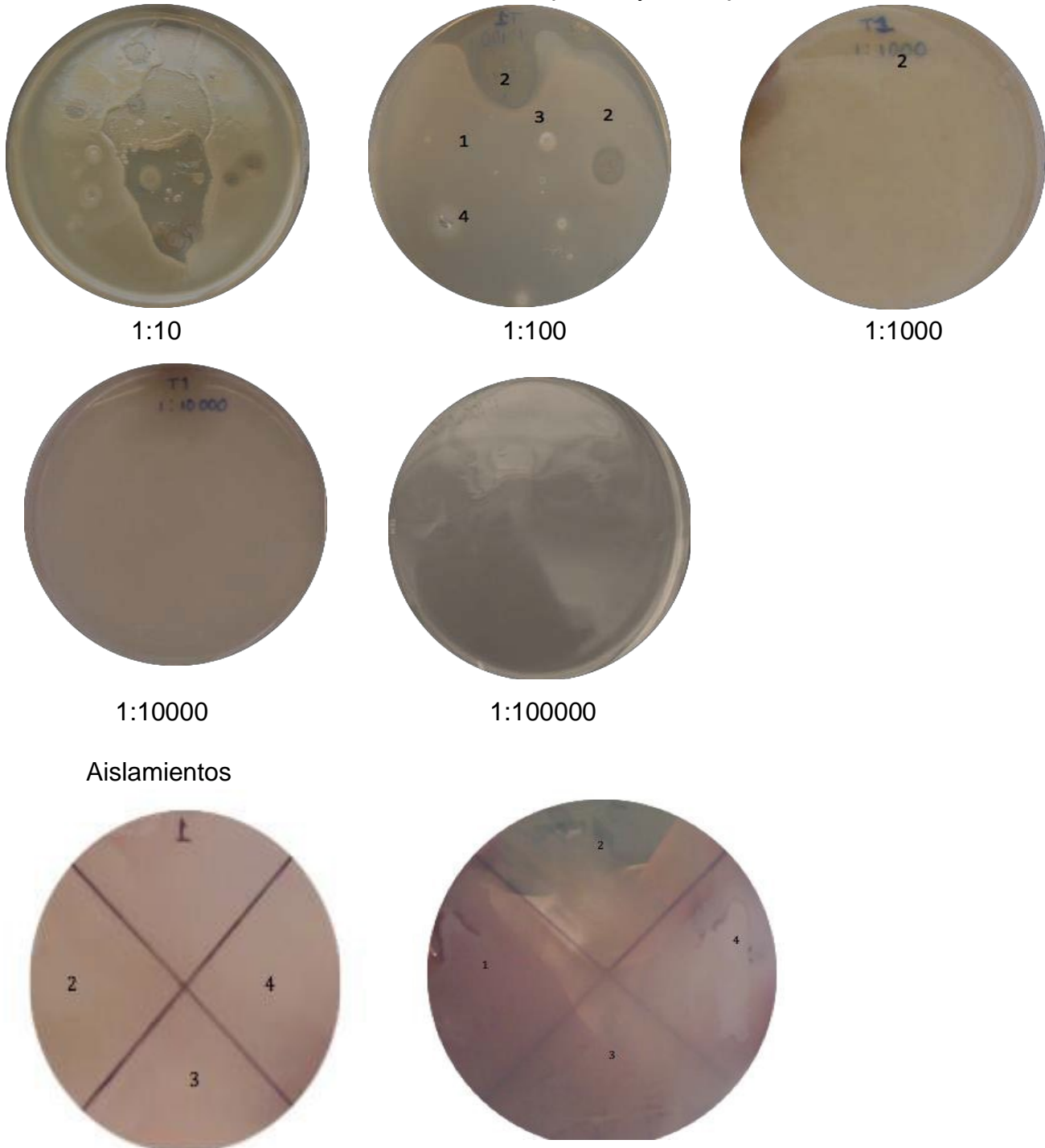
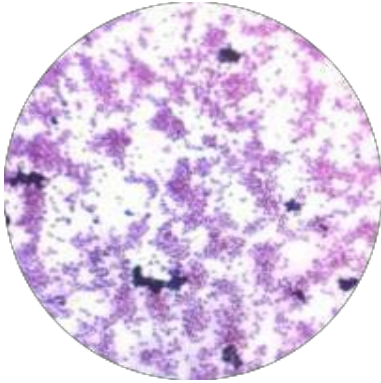
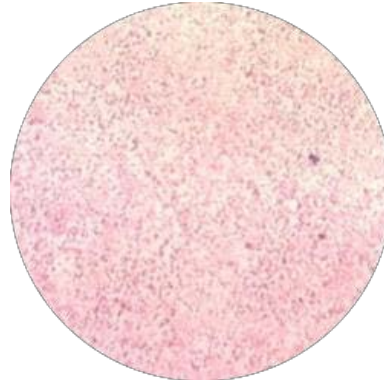


Figura 14. Crecimiento y aislamiento de las colonias representativas

Tratamiento 1



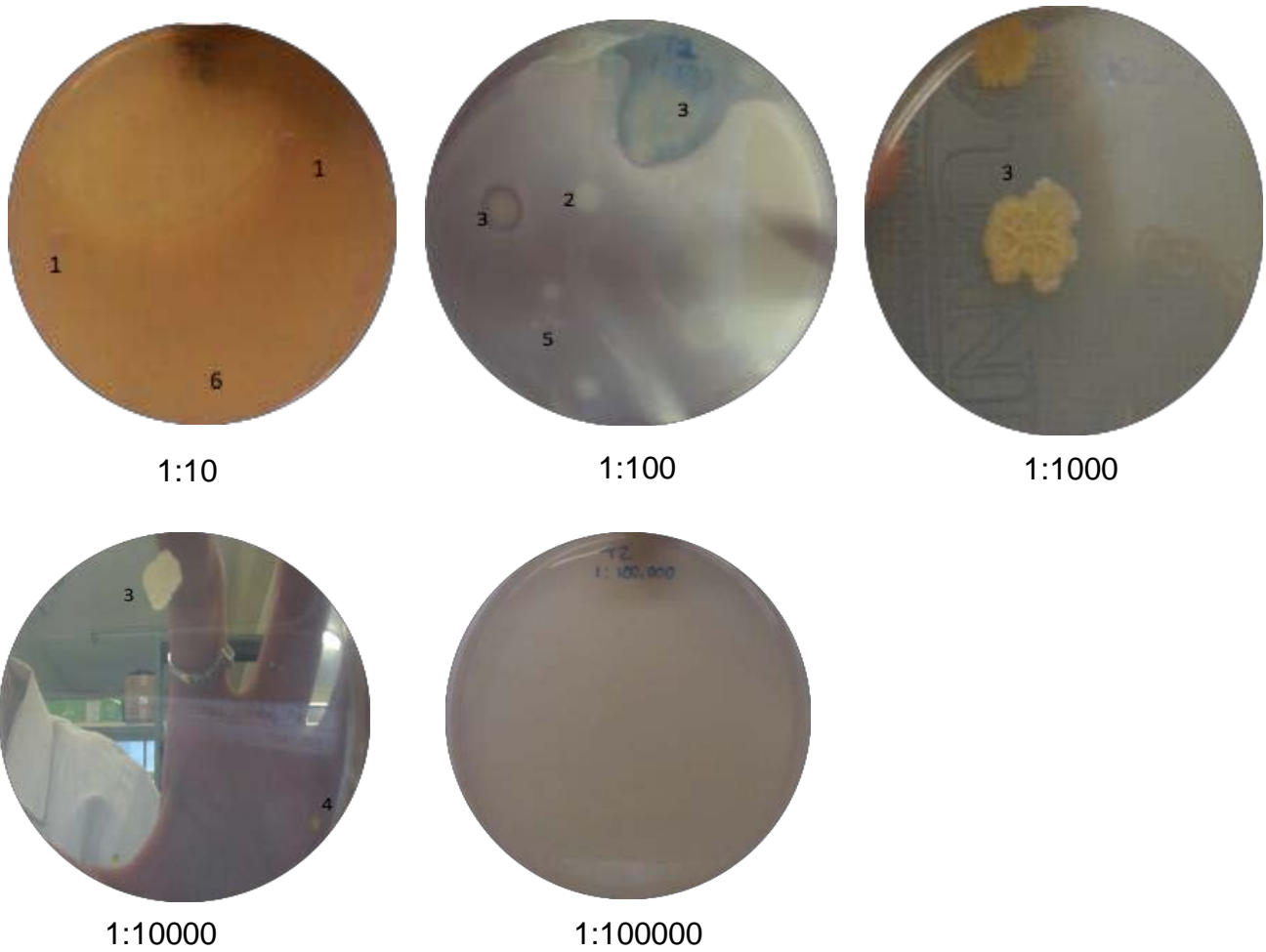
Colonias 1,3 y 4.



Colonia 2.

Figura 15. Tinciones Gram realizadas para la identificación microscópica de las colonias seleccionadas.

7.3.2.2. Colonias aisladas del tratamiento T2 (25% petróleo)



Aislados bacterianos

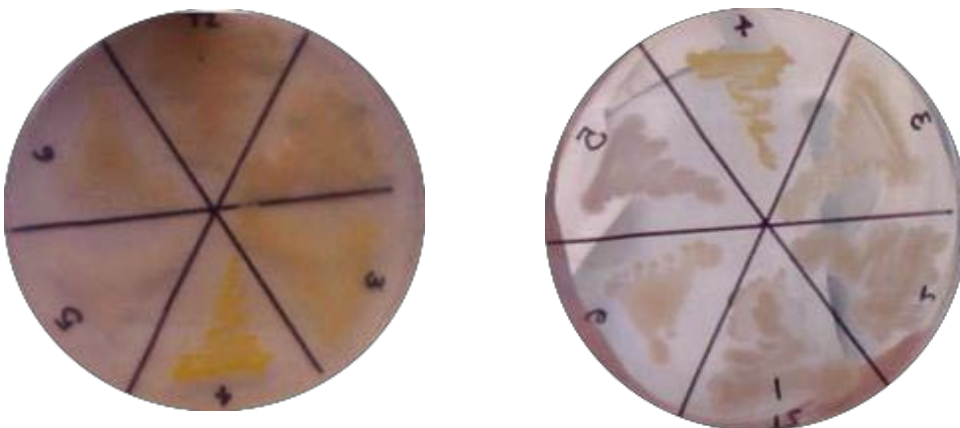


Figura 16. Crecimiento y aislamiento de las colonias representativas del T2

Tratamiento 2

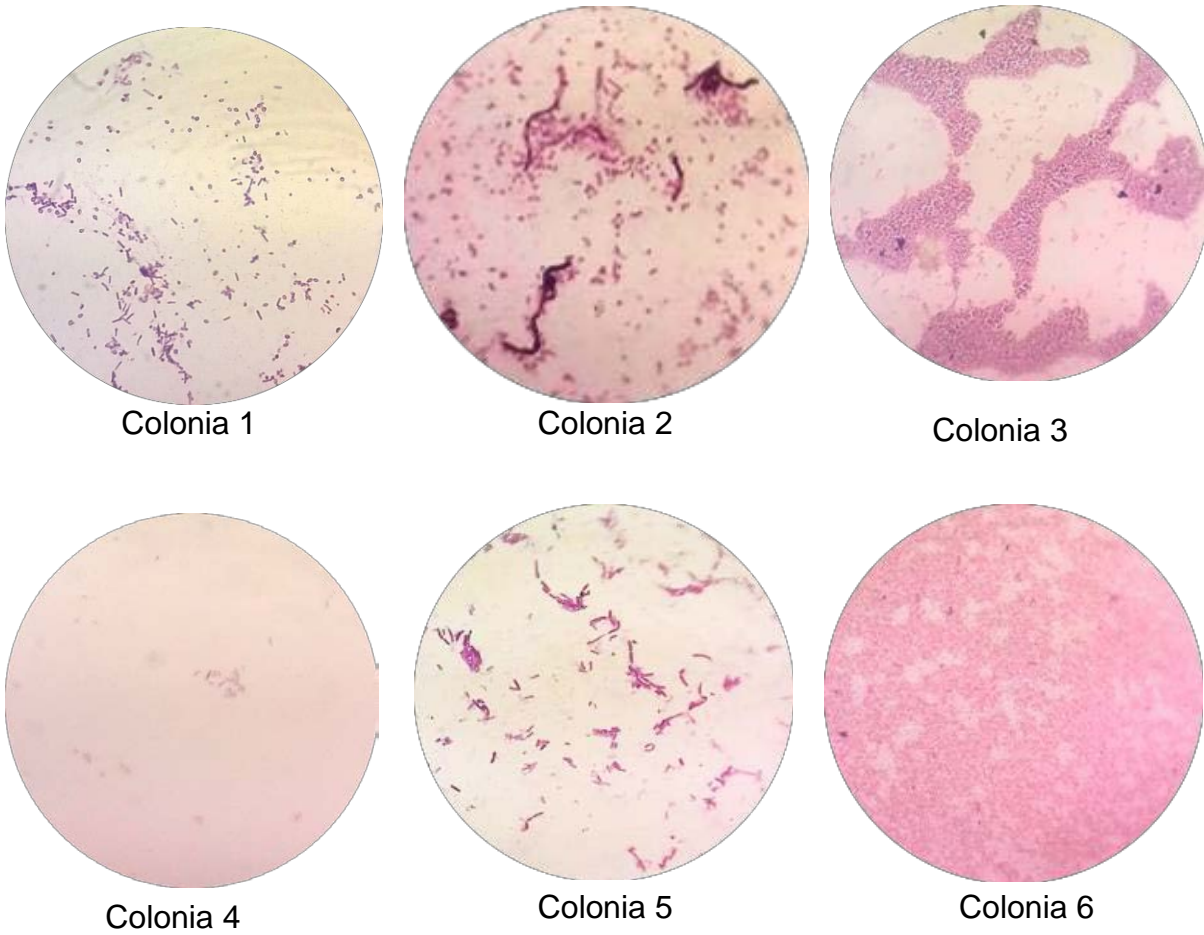
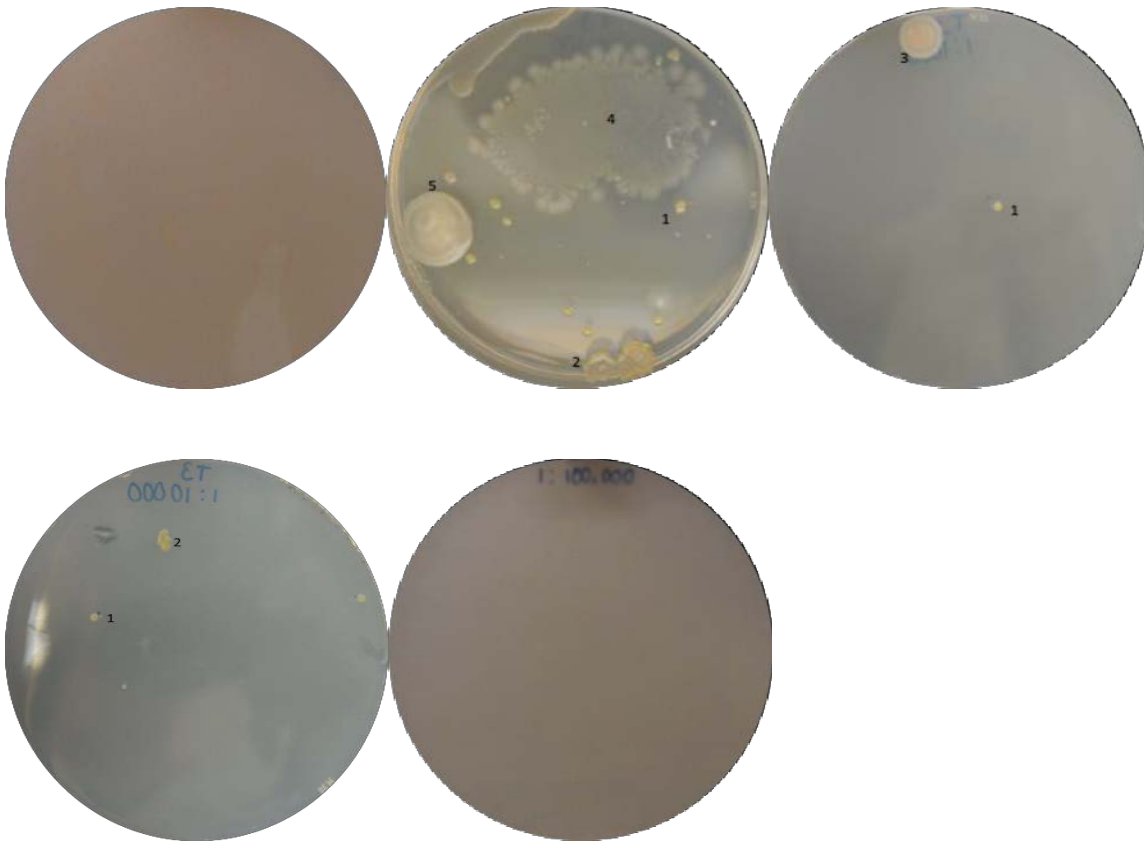


Figura 17. Tinciones Gram realizadas para la identificación microscópica de las colonias seleccionadas.

7.3.2.3. Colonias aisladas del tratamiento T3 (50% petróleo)



Aislados

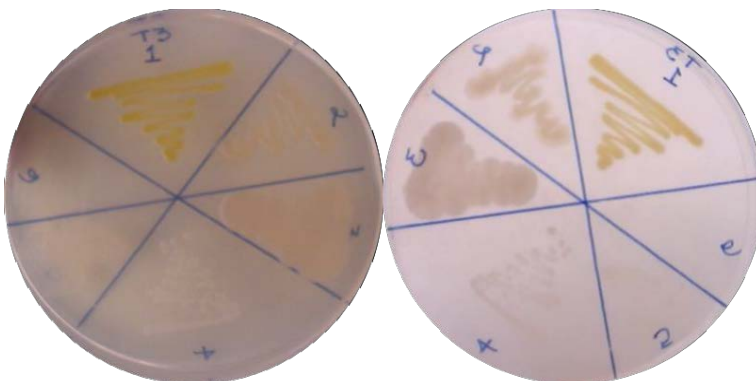


Figura 18. Crecimiento y aislamiento de las colonias representativas del T3

Tratamiento 3

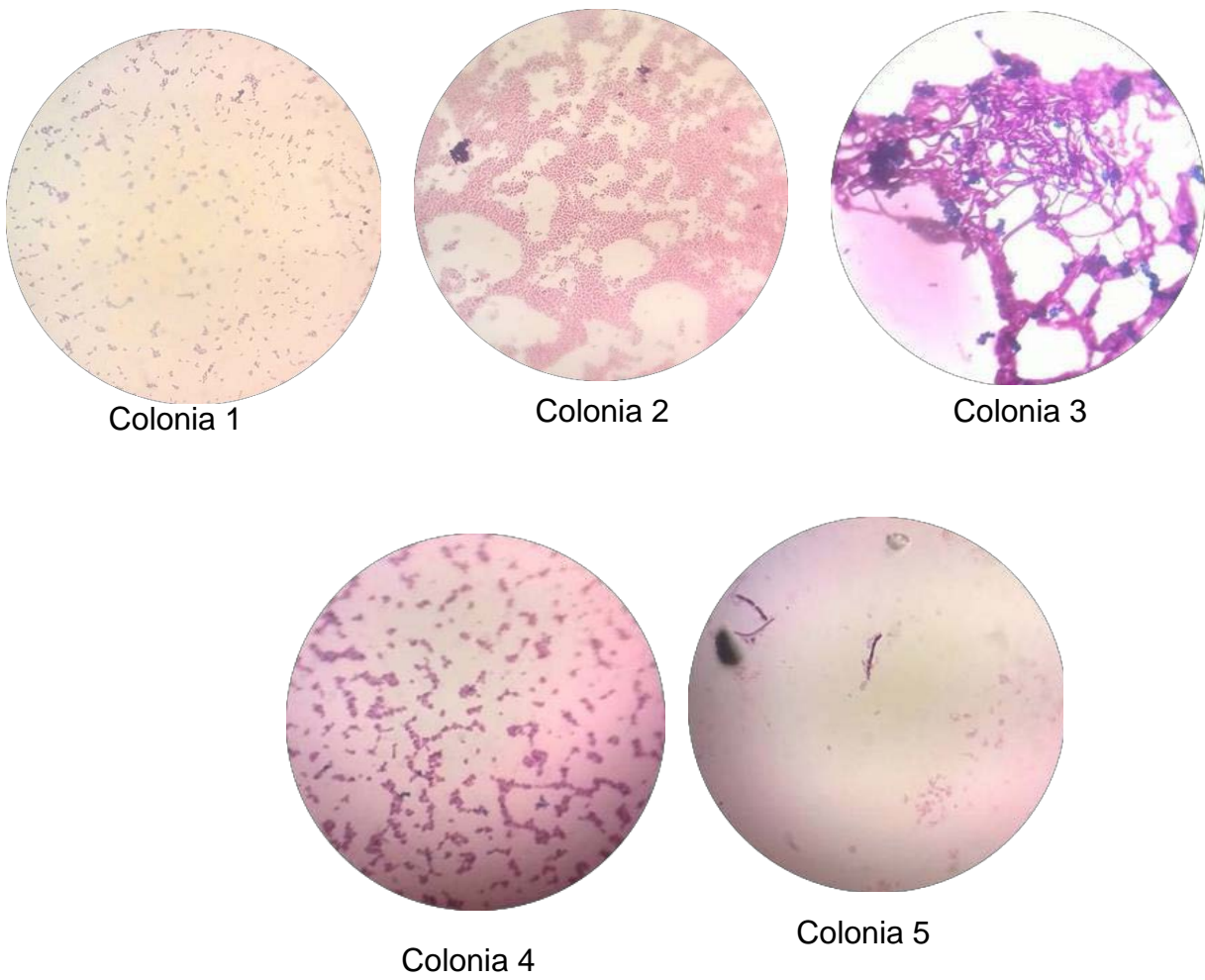


Figura 19. Tinciones gram realizadas para la identificación microscópica de las colonias seleccionadas.

Tabla 16. Colonias aisladas seleccionadas y su caracterización Gram del consorcio metalófilo tolerante a hidrocarburos.

Concentración de petróleo	Colonias aisladas	Características macroscópicas	Características microscópicas	Identificación Gram
10%	1	Mayoritaria, cremosa, borde irregular, mucoide.	Bacilos cortos	Gram +
	2	Incolora, brillante, borde irregular, mucoide.	Bacilos cortos	Gram -
	3	Cremosa, brillante, borde irregular, mucoide.	Bacilos cortos	Gram +
	4	Cremosa, brillante, borde irregular, mucoide.	Bacilos cortos	Gram +
25%	1	Color beige, brillante, borde definido.	Bacilos esporulados	Gram +
	2	Blanca, cremosa, brillante.	Bacilos segmentados, esporulados.	Gram -
	3	Amarilla paja, grumosa, borde irregular, con elevación umblicada.	Bacilos cortos	Gram -
	4	Amarilla, circular, brillante, borde definido, pequeña.	Bacilos segmentados	Gram +
	5	Blanca, puntiforme, pequeña, brillante, borde definido.	Bacilos segmentados, curvos.	Gram -
	6	Color crema, opaca, borde irregular, muy abundante.	Bacilos esporulados	Gram +
50%	1	Amarilla, brillante, cremosa, pequeña, borde regular.	Bacilos	Gram +
	2	Amarilla paja, grumosa, borde irregular.	Bacilos	Gram -
	3	Beige, brillante, borde regular.	Bacilos largos esporulados	Gram +
	4	Blanca, brillante, borde irregular, puntiforme, de gran tamaño.	Cocobacilos	Gram -
	5	Blanca, cremosa, brillante, borde irregular.	Bacilos	Gram -

7.4 Cinéticas de crecimiento

Las cinéticas de crecimiento se realizaron con la finalidad de conocer las fases de latencia, exponencial, estacionaria y de muerte celular de los consorcios obtenidos; para de esta manera realizar el conteo en placa de los microorganismos capaces de sobrevivir con petróleo como única fuente de carbono y establecer el inóculo para las pruebas finales de biodegradación.

7.4.1 Cinética de crecimiento del consorcio hidrocarbonoclasta

Para la realización de la curva de crecimiento del consorcio de bacterias hidrocarbonoclastas se empleó un matraz Erlenmeyer conteniendo 250 mL de medio de cultivo Bushnell Hass con 1g de petróleo crudo como fuente de carbono, el cual se inoculó con una suspensión bacteriana del consorcio descrito en la sección 7.2 precultivada por 13 horas en fase exponencial de crecimiento, con una concentración suficiente para que la densidad óptica inicial a 600nm corresponda a 0.05.

Para el ajuste de la densidad óptica inicial se utilizó la Ecuación 6:

$$DO_1 V_1 = DO_2 V_2 \quad (6)$$

Dónde: $V_1 = \frac{DO_1}{DO_2}$

DO_1 = Concentración del inóculo crecido

V_1 = volumen necesario de inóculo para ajustar a 0.05

DO_2 = Densidad óptica deseada

V_2 = Volumen experimental

Por ejemplo el cálculo siguiendo la ecuación 6 se realizó de la siguiente forma :

$$V_1 = \frac{(\text{---}) - (\text{---})}{(\text{---}) - (\text{---})}$$

Posteriormente los matraces se sometieron a una agitación de 150 rpm a 37°C. Seguidamente se analizó la evolución del crecimiento bacteriano tomando muestras de 3.5 mL de la suspensión bacteriana a distintas horas y midiendo su densidad óptica con un espectrofotómetro UV-VIS *Genesys 5* (Fig. 20).

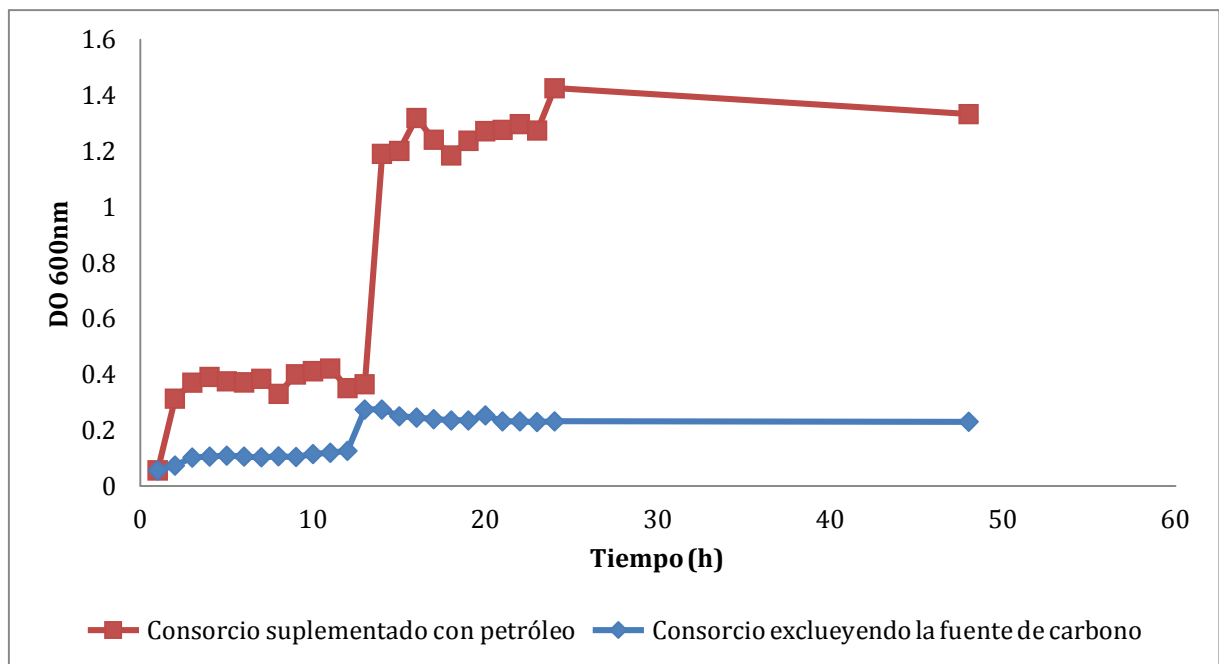


Figura 20. Curva de crecimiento en medio Bushnell Hass del consorcio bacteriano hidrocarbonoclasta suplementado con petróleo (gráfico en rojo) y consorcio hidrocarbonoclasta sin fuente de carbono (gráfico azul).

A partir del comparativo de las curvas de crecimiento realizadas (Figura 20) pudo deducirse que la fase de latencia es de aproximadamente 12 h y que la fase de crecimiento exponencial es cercano a la hora 13, luego de este tiempo el cultivo entra a la fase estacionaria y posteriormente a la de muerte.

Esté grafico nos muestra la tendencia de las BHCC's en los que se ven envueltos los procesos de degradación rápida-lenta, la cual es característica de este tipo de microorganismos, debido a que se ven envueltos cambios en la dominancia y diversidad de determinadas especies lo cual esta influido a su vez por la disponibilidad o no de sustrato, además de la capacidad metabólica de las mismas, estas conjeturas quedaron demostradas por Kaplan y Kitts (2004).

7.4.2 ética de crecimiento del consorcio metalófilo tolerante a hidrocarburos

Davis *et al.* (2014), llevaron a cabo un estudio en el cual se centraron en la actividad de un consorcio constituido por *Pseudomonas spp.* y *Stenotrophomonas spp.*, en presencia de Zn, Cu y Pb en diferentes concentraciones, demostrando que cierto tipo de microorganismos tienden a formar biosurfactantes que ayudan en la promoción de la emulsificación de productos químicos hidrófobos (e.g. hidrocarburos).

El suelo de estudio contaba con concentraciones de metales pesados por encima de la norma oficial mexicana (NOM-147) siendo los de mayor concentración Zn, Pb y Ni, los resultados se muestran en la sección 7.1.3 (Cárdenas 2010).

El siguiente gráfico (Figura 21) del consorcio metalófilo tolerante a hidrocarburos muestra una tendencia muy diferente a la perteneciente al consorcio de BHCC's, esto se debe a que dichos microorganismos no están especializados y no cuentan con la capacidad metabólica del consorcio anterior, sin embargo podemos inferir que dicho consorcio utilizó en primera instancia los hidrocarburos alifáticos que son más susceptibles al ataque microbiano,

seguidos por los hidrocarburos ramificados aromáticos de bajo peso molecular y posiblemente los aromáticos (Leahy y Colwell,1990;Phol y Leskovsek,2002) y ciclo alcanos de alto peso molecular no los pudo utilizar y debido a esto se da la fase de muerte, este comportamiento del consorcio pre-enriquecido, demuestra que los microorganismos que han estado anteriormente expuestos a cierto tipo de contaminante son más susceptibles a la adaptación de condiciones aún más adversas, aunque su capacidad no se iguale a la de un microorganismo nativo presenta buena respuesta al hidrocarburo.

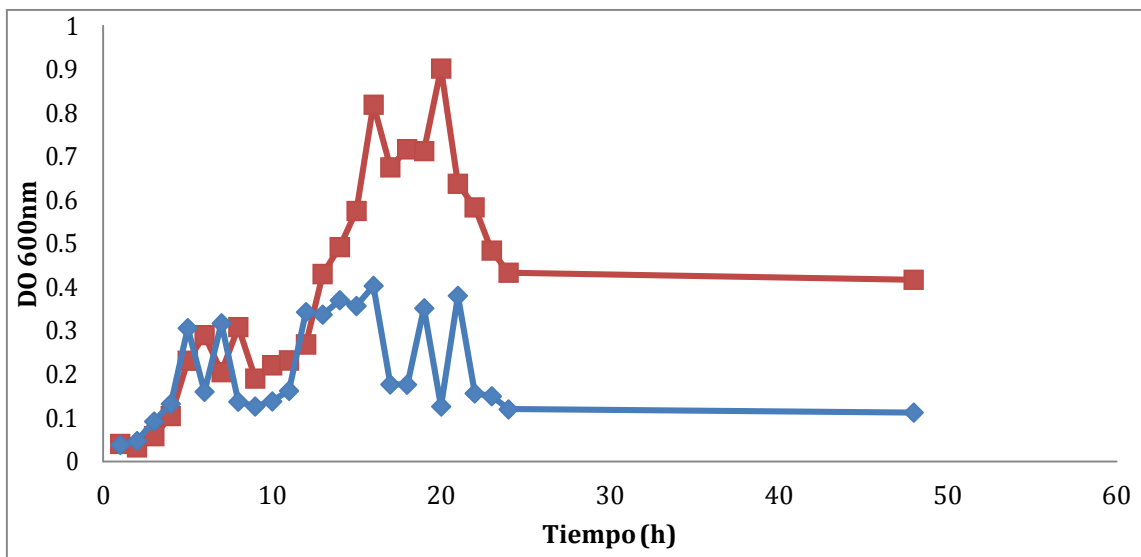


Figura 21. Comparación de crecimiento del consorcio metalófilo tolerante a hidrocarburos en medio Bushnell Haas excluyendo la fuente de carbono (grafico azul) y suplementando el medio con petróleo crudo (1 g en 250 mL, pH 6.5±2, 37°C, 200 rpm).

En las cinéticas de crecimiento se puede observar un crecimiento considerable al incluir la fuente de carbono difícil de asimilar, además, es importante mencionar que en presencia de otros contaminantes en particular los metales pesados, las bacterias producen tensoactivos, la promoción de la emulsificación de productos químicos hidrófobos en particular los hidrocarburos. Como lo demostraron con anterioridad Mulligan *et al.* (1999) y Jayabarath *et al.* (2009) los tensoactivos promueven la eliminación del contaminante; se puede inferir que dicho consorcio posee estas características ya que, las colonias que desarrolló eran de aspecto gelatinoso y difícil agarre al momento de realizar los aislados, otro aspecto a considerar es la observación de grandes micelas en las tinciones gram en las que se observa claramente como las bacterias se encuentran agrupadas alrededor del contaminante que utilizan como fuente de carbono.

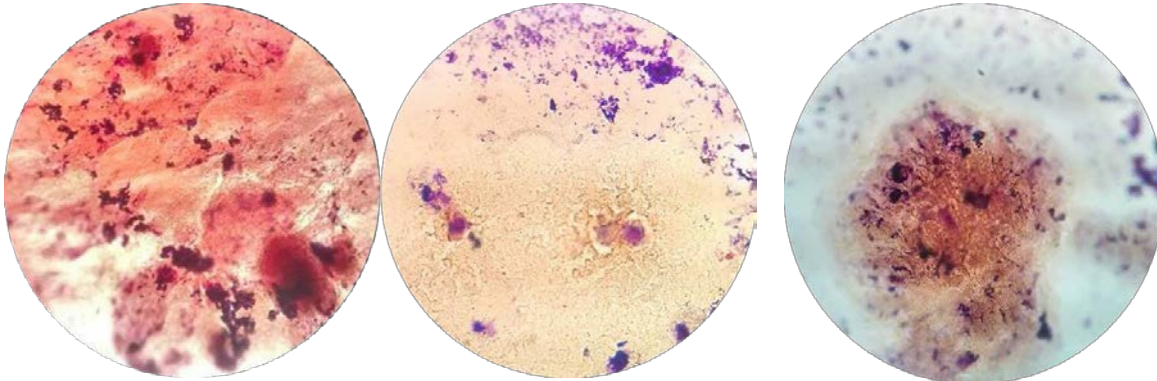
7.5 Crecimiento y propagación en medios selectivo Bushnell Haas

Con el fin de comprobar que las bacterias aisladas de las diferentes muestras de suelo tuvieran potencial para la biodegradación de hidrocarburos, se cultivaron en un medio selectivo Bushnell Haas suplementado con 1g de petróleo por cada 250mL de medio con un inóculo estandarizado de 60000 UFC para el consorcio hidrocarbonoclasta y 56600 UFC para el consorcio metalófilo tolerante a hidrocarburos. Esto en base al recuento en placa que se realizó a la par de la curva de crecimiento de cada uno de los consorcios.

Mahaligam y Sampath (2014), utilizaron diesel a diferentes concentraciones 1,3 y 5 % para suplementar el medio Bushnell Haas y que este actuara como la fuente de carbono, obteniendo resultados favorables en los que se demostró que la concentración optima fue el 1%.

Tomando como punto de partida, se decidió trabajar con 1 g de petróleo crudo por cada 250 mL de medio de cultivo, una cantidad significativa de contaminante en comparación con trabajos anteriormente realizados.

En las siguientes imágenes se puede observar la formación de grandes micelas en las que los consorcios de bacterias se encuentran rodeando las fuentes de carbono en este caso petróleo, las imágenes obtenidas son muy similares a las presentadas por el grupo de investigación del Laboratorio Nacional Lawrence Berkeley (EUA), además de la Universidad de Bangor (India).



(a)



(b)

Figura 22. a) Imágenes microscópicas obtenidas del consorcio BHCC's en medio Bushnell Haas y petróleo como única fuente de carbono.

b) Holman (2011) . Bacterias degradadoras de hidrocarburos en aguas profundas después de un derrame de crudo en el golfo.

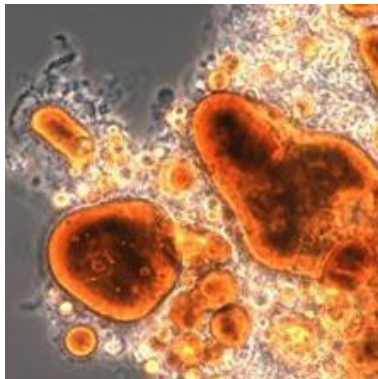


Figura 23. Bacterias degradadoras de hidrocarburos (2010). Bangor University.

7.6 Prueba final de biodegradación en muestra real (pasivo ambiental)

7.6.1 Tratamientos

El estudio consistió en preparar 12 tratamientos con las características descritas en la metodología sección 4.1.

La muestra de suelo contaminado por una larga exposición (hasta 18 años) a los contaminantes (pasivo ambiental), seleccionada para realizar la prueba final de biodegradación es un punto muy importante a destacar dentro del presente trabajo experimental ya que este tipo de muestras son poco utilizadas por los investigadores, por la incertidumbre y complicaciones propias de una muestra real, en primera instancia porque la concentración del contaminante es desconocida, y en segunda porque si la concentración encontrada es muy elevada, es muy difícil obtener resultados favorables en los que las concentraciones llegan a estar por debajo de los límites máximos permisibles en periodos de tiempo muy cortos (la duración de un experimento); por esta razón es que la mayor parte de los artículos publicados relacionados con la degradación de hidrocarburos las muestras de suelo son contaminadas de forma artificial, mediante la elaboración de mesocosmos con una concentración conocida de un solo contaminante en específico. Además la mayoría de los reportes experimentales trabajan a concentraciones que sobrepasan por poco las normativas ambientales.

En la prueba de biodegradación, las mediciones de HTP se realizaron durante los días 1, 4, 7, 14, 21, 30 un aspecto igual de importante a destacar es que fue realizada aunque en interiores, bajo condiciones ambientales naturales no controladas, las temperaturas en °C durante el mes de trabajo experimental estan representadas en la siguiente figura 28 y se muestran los máximos grados alcanzados y los mínimos y en la figura 29 se muestra el montaje experimental

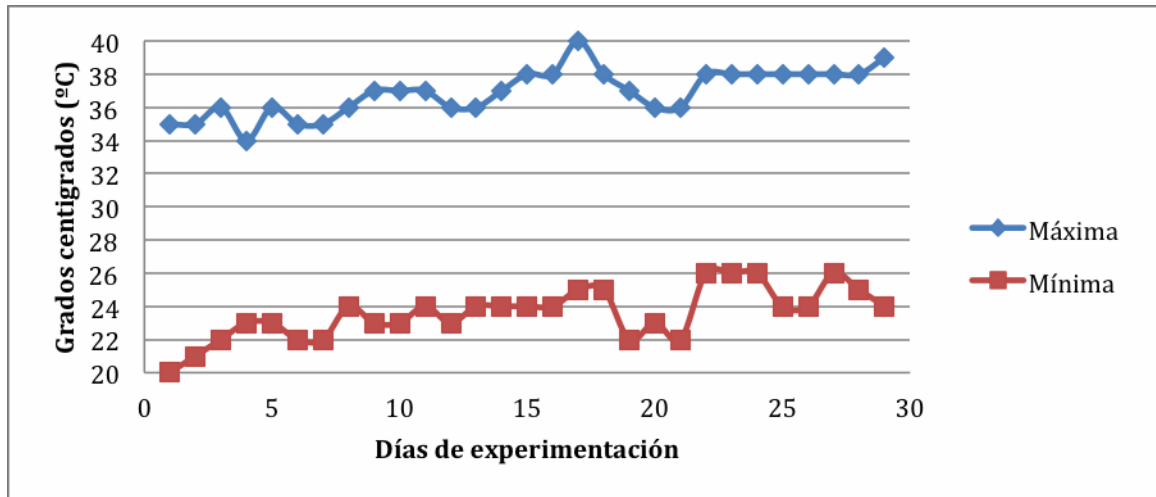


Figura 24. Temperatura alcanzada durante el periodo de experimentación, grafico azul muestra la temperatura máxima y grafico rojo la mínima en °C (tomado de accuweather).



Figura 25. Montaje de los tratamientos, para prueba final de biodegradación.

7.6.2 Análisis de HTP

Los análisis realizados para la medición de HTP, se realizaron por triplicado, se analizó desviación estándar, error estándar y se tomó como dato principal el promedio. La concentración inicial de HTP fue de 191648 mg por kg de suelo seco. lo que indica que el índice de contaminación presente en el suelo de estudio sobrepasaba casi 17 veces más lo establecido por la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003, ya que dicha norma establece un LMP 11500 mg por kg de suelo seco en zonas industriales para los HTP en la siguiente tabla (tabla 17) se muestran los resultados promedio obtenidos y su error estándar .

Tabla 17. Concentración de HTP (mg/kg de s.s)

Tratamiento	Día 1	Día 4	Día 7	Día 14	Día 21	Día 30	Remoción (%)	Remoción (%) - ANA	Incremento (%) de remoción con respecto a ANA
ANA	191648 ± 6992	190882 ± 3972	189873 ± 8318	184189 ± 4385	180811± 374	180811± 899	5.6	5.6	-----
BIOESTIMULACIÓN									
Suelo + Landfarming	191648 ± 6992	186360 ± 6034	187855± 8466	186540± 2795	177829± 1483	171531± 5581	10.4	4.8	86%
Suelo + Bokashi	191648 ± 6992	177600 ± 5154	164746± 1458	189248± 8592	185847± 3139	170087± 1868	11.2	5.6	100%
Suelo + Biofertilizante	191648 ± 6992	169670 ± 3862	159592± 326	179000± 6874	179069± 1967	174317± 8275	9.04	3.44	61%
Suelo + Alga	191648 ± 6992	189190 ± 2499	157010± 7903	186353±10591	181454± 840	144822± 1582	24.4	18.8	336%
Suelo + Zacate	191648 ± 6992	187794 ± 2243	167268± 2586	186088± 1424	171956± 437	129745± 2071	32.3	26.7	477%
BIOAUMENTACIÓN									
Suelo + Consorcio	191648 ± 6992	178925 ± 8720	161300±5737	175125±5845	174371±2029	165927±2047	13.4	7.8	139%
Suelo+ Consorcio + Landfarming	191648 ± 6992	140792 ± 8774	149747± 8873	181206± 3777	179447± 2873	162673± 2069	15.11	9.51	170%
Suelo + Consorcio + Bokashi	191648 ± 6992	172582 ± 845	161562± 2453	183600± 4536	188347± 460	163973± 414	14.4	8.8	157%
Suelo + Consorcio + Biofertilizante	191648 ± 6992	189662 ± 12049	165049± 9603	163818± 3740	188347±12823	163973± 4244	19.9	14.3	255%
Suelo + Consorcio + Alga	191648 ± 6992	173183 ± 6904	158654± 2681	174727± 5865	161241± 2313	156865± 1266	18.1	12.5	223%
Suelo + Consorcio+ Zacate	191648 ± 6992	180204 ± 7015	170533± 1694	185306± 1174	155741± 2670	143319± 2299	25.1	19.5	348%

ns

ns

ns

ns

**

**

(ANA= Atenuación Natural Asistida, resultados promedio, n=3 ± error estándar, ns: no hay diferencia significativa, ** diferencia significativa)

7.6.3 Análisis de varianza de un factor

Los resultados obtenidos al final de la prueba de biodegradación fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) para comparar las diferencias significativas entre los tratamientos respecto a las repeticiones realizadas, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre los días 21 y 30. Los tratamientos realizados son 11 y adicionando el ANA obtenemos un total de 12 muestras, con 3 repeticiones para cada una, lo que nos da un total de 36 experimentos.

La relación de las varianzas entre grupos y dentro de los grupos arrojó un valor para el día 21 de $F = 3.4322$ y para el día 30 de $F = 16.6390$. *El valor crítico de $F(0.05)$* , para los correspondientes grados de libertad (entre grupos $v_1 = 11$ y dentro de los grupos $v_2 = 24$), es 2.2163 para ambos casos; por lo tanto los diferentes tratamientos difieren significativamente respecto a las variaciones entre las repeticiones realizadas.

Las diferencias significativas entre el día 21 y 30 se atribuyen a que en los primeros días del experimento las comunidades microbianas se encontraban en una etapa de pre-adaptación, en la que aún no se encontraban metabólicamente activos.

7.6.4 Estudio cinético de la remoción de HTP

Según reportes de cinéticas de degradación; por un lado los, compuestos derivados de hidrocarburos como BTEX y MTBE (Acuña *et al.*, 2004), los HTP presentan mecanismos de degradación que se ajustan a un modelo cinético de primer orden (Ledezma *et al.*, 2015). La siguiente ecuación muestra la dependencia de la concentración de HTP en función del tiempo para una cinética de primer orden.

$$HTP = HTP_0 e^{-kt} \quad (7)$$

Dónde :

HTP = concentración de HTP al tiempo t

HTP_0 = concentración inicial de HTP
= tiempo

= constante de rapidez

Para cada uno de los tratamientos estudiados, se calculó la constante de rapidez para lo cual se realizó una regresión lineal de los datos de logaritmo natural de concentración de HTP contra tiempo, según la ecuación anterior en su forma logarítmica:

$$\ln_{HTP} = -kt + \ln_{HTP_0} \quad (8)$$

Por lo tanto el valor negativo de la pendiente obtenida corresponde a la constante de rapidez. Además, se calculó el tiempo de tratamiento necesario para disminuir la concentración de HTP al límite máximo permisible que establece la Norma Oficial Mexicana (NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012), para lo cual se utilizó el valor de constante de rapidez obtenido y un valor de concentración de HTP igual a 11500 mg/kg correspondiente a una zona industrial.

En la siguiente Tabla 18 se muestra un acumulado de las constantes de rapidez determinadas, y el tiempo calculado necesario para la remediación del suelo, en cada tratamiento.

Tabla 18. Constantes de rapidez y tiempo estimado para la biorremediación de suelos contaminados con HTP.

LMP: Límite Máximo Permissible para zona industrial, según la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 (11500 mg/kg).

Tratamiento	k (días⁻¹)	Tiempo de tratamiento para alcanzar LMP (días)
<i>ATENUACIÓN NATURAL ASISTIDA</i>	2.33E-03	1423
<i>BIOESTIMULACIÓN</i>		
Suelo + Landfarming	3.55E-03	933
Suelo + Bokashi	5.48E-03	605
Suelo + Biofertilizante	5.29E-03	623
Suelo+ Alga	1.01E-02	331
Suelo + Zácate	1.23E-02	272
<i>BIOAUMENTACIÓN</i>		
Suelo + Consorcio	3.55E-03	827
Suelo + Consorcio + Landfarming	5.28E-03	630
Suelo + Consorcio + Bokashi	6.38E-03	519
Suelo + Consorcio + Biofertilizante	7.29E-03	451
Suelo + Consorcio + Alga	4.81E-03	675
Suelo + Consorcio + Zacate	9.16E-03	359

PEMEX (2003) realizó un programa de muestreo en un sitio contaminado, que arrojó valores de HTP de entre 50,000 y 120,000 mg/kg en donde se aplicaron bacterias nativas acondicionadas por especialistas, combiandas con aminoácidos, enzimas, vitaminas y minerales para aumentar la capacidad de oxigenación. A los 30 días se obtuvieron niveles de HTP muy inferiores a las 5,000ppm, lo que abre da una perspectiva del potencial del consorcio BHCC's ya que la concentracion inicial de estudio fue de 191148 mg/kg de suelo y en lapso de 30 días combinado con otros nutrientes la concentración más baja alcanzada mediante la técnica de bioaumentación fue de 143319 mg/kg de HTP, lo que representa una remoción de más de 47000 mg/kg de HTP.

Además hablar de biorremediación en un lapso no mayor a 1 año es un gran avance ya que generalmente estos procesos son muy largos por ejemplo; Cárdenas (2010) calcula el tiempo de remediación para un suelo con altas concentraciones de Zn en un periodo no menor a 12 años para los HTP el tiempo depende de la concentración del contaminante, la microbiota del lugar, si hay adición de nutrientes, etc; por lo que es muy normal hablar de procesos de biorremediación en años.

Cabe mencionar que cada sitio tiene sus particularidades y no es factible generalizar a grandes rasgos

Otro aspecto de interés durante el análisis de los resultados es el apreciable aumento en la concentración de HTP y esto es reportado de igual manera por Margesin y Schinner (2001) que indican que, luego de un descenso inicial de HTP, se produjo un leve incremento aparente de esta variable debido a la producción de tensoactivos microbianos los que causan esta liberación o movilización de hidrocarburo, también Serrano *et al.*, (2006) afirman que puede haber una moderada elevación en los niveles de HTP después de los 40 días de la contaminación, debido a que la degradación de los hidrocarburos más complejos genera subproductos no degradados que contribuyen a dicho asenso.

7.6.4.1 Bioaumentación concentración de HTP (mg kg^{-1} de s.s) tras el periodo de prueba.

En la siguiente gráfica se muestran la tendencia de cada uno de los tratamientos, ajustados con el modelo cinético de primer orden (sección 7.6.3) donde es notorio el efecto del consorcio aislado y de los nutrientes adicionados a cada uno de los tratamientos sobre la concentración inicial de HTP viéndose favorecido el porcentaje de remoción con la adición de nutrientes, en la que se observa que la constante de velocidad más alta obtenida $K(\text{días}^{-1})$ de $9.16\text{E-}03$ perteneciente al tratamiento de suelo + consorcio + zacate presentó mayor índice de remoción del contaminante en un lapso de 30 días, esto debido a que las plantas tienen diferentes mecanismos eficientes para la desintoxicación de contaminantes en donde participan diferentes enzimas, como el citocromo P450 (Anderson. *et al* 1993)

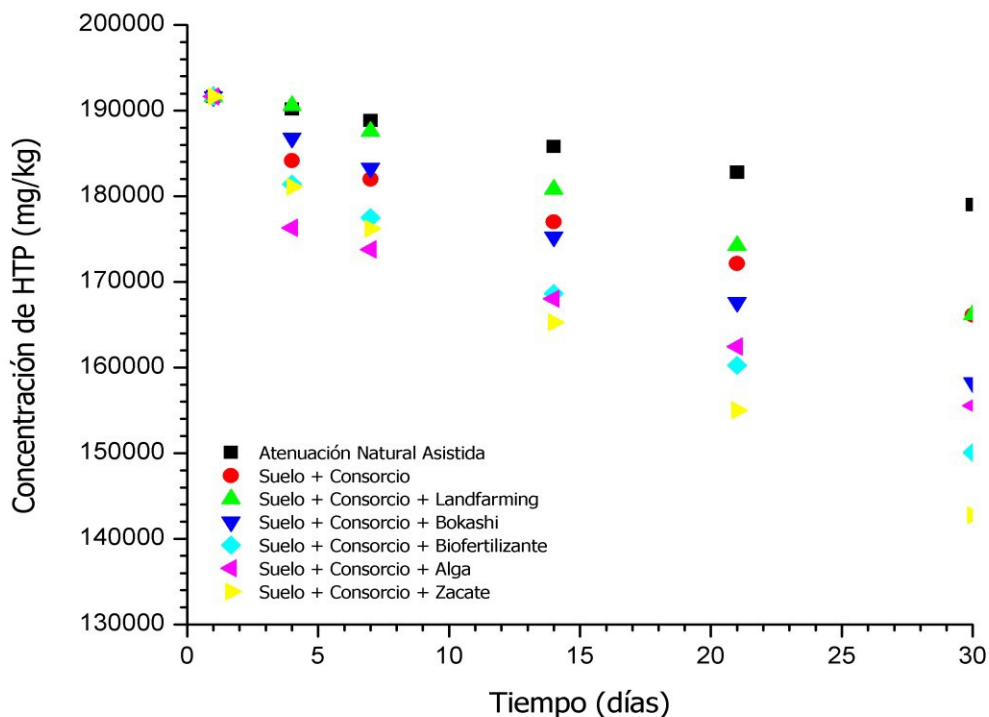


Figura 26. Comportamiento de los tratamientos de bioaumentación con respecto a la atenuación natural asistida.

En el gráfico (figura 26) se puede notar como todos los tratamientos muestran un efecto directo sobre la concentración inicial de HTP, siendo el tratamiento con alga y zacate los que presentan mayor índice de remoción y esto se atribuye a que tienen tendencia a bioacumular el contaminante.

La mayoría de los estudios sobre bioacumulación en algas, se han realizado primordialmente en microalgas (fitoplancton) y se ha comprobado que la acumulación de compuestos orgánicos, no afecta el metabolismo o el crecimiento de las células. Además de que éstas tienen un radio de bioacumulación para el DDT, aldrín y dieldrín muy alto (Calva y Torres, 2008).

En el caso de la técnica de atenuación natural asistida, también bajó el nivel de concentración inicial durante el periodo experimental esto se debe a que contó con condiciones de humedad y temperatura que influyeron en la respuesta del suelo hacia el contaminante, esta técnica consiste en la aceleración de los procesos naturales que tienen lugar en el suelo mediante la aplicación de factores como en este estudio de humedad controlada y la utilización de plantas (Adriano *et al.*, 2002) para disminuir la movilidad y la biodisponibilidad de los elementos contaminantes (USEPA, 2000; Mench *et al.*, 2003) lo que proporciona mayor certeza a los resultados obtenidos en los que se vieron involucrados bacterias y nutrientes adicionales, Ramírez y Argüelles (2004) midieron la respuesta de la atenuación natural en suelos contaminados con hidrocarburos variando el porcentaje de humedad (15 al 30%), la adición de nutrientes y surfactantes por separado, concluyendo que el alto contenido de agua constante presentó eficiencias de remoción lo que indica que los resultados obtenidos en el presente estudio son el producto de la acción de la flora natural del suelo además de verse ampliamente beneficiado por las condiciones físicas que se le proporcionaron, es importante mencionar que el suelo de estudio al ser removido de su sitio original y realizar el proceso de tamizaje hasta su disposición final también se vio promovida la respiración del mismo y esto también favoreció la actividad microbiana.

Latha y Kalaivani (2012), utilizaron el método gravimétrico para realizar la cuantificación de los hidrocarburos al final de la prueba de biodegradación por

medio de un consorcio bacteriano, previamente identificado, de *Bacillus*, *Lactobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Zoopage*, y *Articulosporium*. *Bacillus sp* ellos concluyen la mayoría de las bacterias aisladas durante el tratamiento de biorremediación presentan esporas y estas pueden actuar como un mecanismo de protección contra el contaminante.

Salanitro *et al* (1997), realizó un estudio de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos y midió la respuesta de una variedad de plantas ante el contaminante; el método que utilizó fue un método gravimétrico por medio de Soxhlet un método sumamente similar al método 418.1 establecido por la EPA en el que obtuvo según su reporte una degradación del contaminante cercana al 97% con una concentración inicial de TPH de 27 000 mg/Kg en suelo base seca (200g) en un periodo de 11 meses, este análisis en particular muestra un panorama del trabajo a destacar dentro del desarrollo experimental realizado ya que las cantidades de suelo a tratar son muy diferentes, la concentración inicial es mucho mayor, las condiciones de trabajo fueron a temperatura ambiente y el consorcio empleado proporciono resultados favorables para el lapso de un mes.

Estudios más recientes, por ejemplo Roy *et al* ., (2014) emplearon el método gravimétrico modificado según Das y Mukherjee (2007), éste básicamente consistió en tomar 10 g de suelo y extraerlo con 100 ml de hexano, cloruro de metileno y cloroformo combinar los tres extractos agregar Na₂SO₄ llevar a sequedad por medio del rotaevaporador y tomar el peso final.

7.6.4.2 Bioestimulación concentración de HTP (mg Kg⁻¹ de s.s) tras el periodo de prueba.

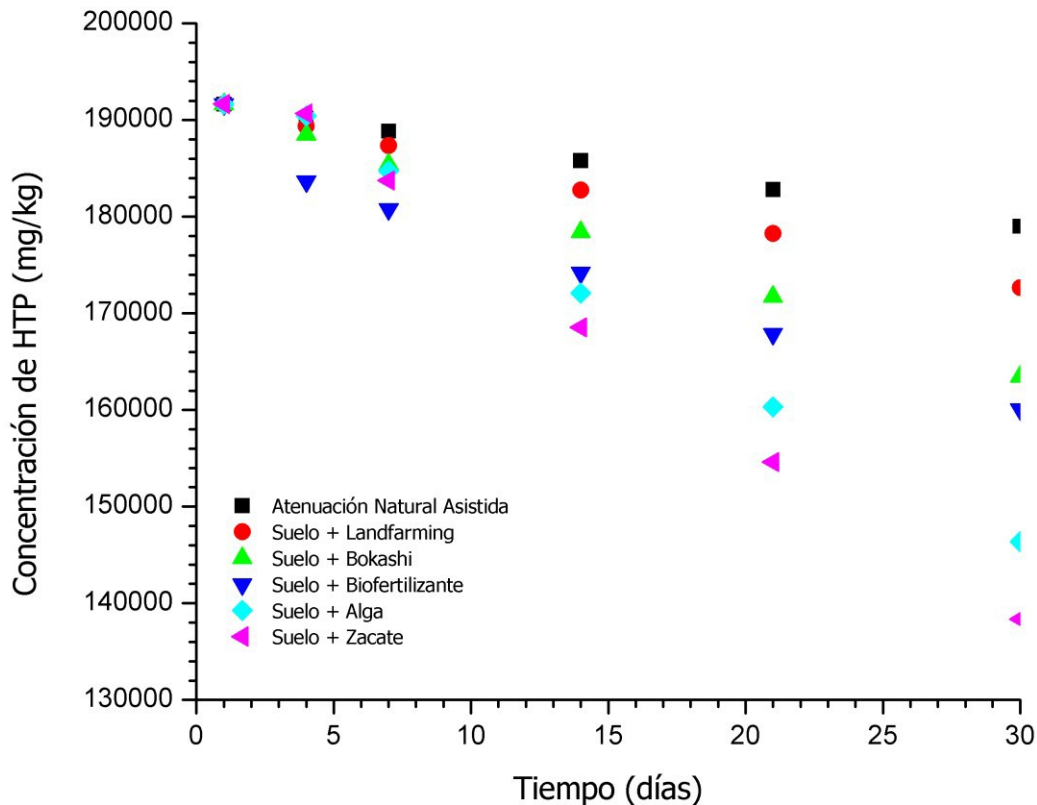


Figura 27. Comportamiento de los tratamientos de bioaumentación con respecto al tratamiento de atenuación natural asistida .

En la determinación de HTP presentes en el suelo después de los 30 días, se observó nuevamente que la mayor remoción se encuentra en el tratamiento con zacate, lo que nos indica que resultados similares han sido obtenidos por Martínez *et al.*, 2008 en el cual realizaron un estudio para observar si existe relación entre la humedad del suelo, la presencia de un inóculo microbiano exógeno y la actividad enzimática de Citocromo P4501A producido en la raíz de *Cyperus laxus*, a las raíces crecidas se les determinó la actividad enzimática, y concluyen que aun habiendo diferencias entre las condiciones de humedad, los tratamientos con inóculo presentaron una mayor actividad, conformando que

existe una relación entre las plantas y microorganismos estos resultados son comparables con los obtenidos en el presente estudio puesto que los mayores índices de remoción acumulada fueron presentados por la técnica de bioaumentación; pero para ambas técnicas el tratamiento que incluía la planta se vio favorecido . Otros trabajos similares reportan lo siguiente, Brito *et al.*, (2007) utilizó un proceso de biorremediación en el que aplicó varias cepas bacterianas nativas tomadas de los alrededores de los sitios contaminados por petróleo, además del tratamiento a la tierra que consistió en airearla y regarla periódicamente, ellos realizaron análisis a los 21 y 31 días, donde se obtuvieron niveles de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) muy inferiores a las 5000 ppm, los lugares en los que se aplicó el tratamiento por más de 90 días alcanzaron valores de HTP por debajo de 3000 ppm.

Este trabajo nos da un panorama del reto al que se enfrentó este estudio ya que suelo con el que se trabajo era un caso extremo de contaminación, ya que las concentraciones estaban por encima de las 190000 ppm, y sin embargo el consorcio empleado para el proceso de biorremediación mostró una alta capacidad de reducción de los HTP , ya que un lapso de 30 días llevo a bajar las concentraciones en un 139% más que el tratamiento de atenuación natural asistida lo que indica que requiere un programa de biorremediación más largo, por la misma naturaleza del suelo además de que el consorcio no fue suplementado con vitaminas, enzimas o algún otro tipo de nutriente que potenciara su actividad metabólica como en el estudio anterior.

Balderas y Sánchez (2015), utilizaron la técnica de bioestimulación en un suelo contaminado de forma artificial con aceite residual automotriz a 75000 ppm en los que adicionaron una solución mineral, mantuvieron la humedad en un 67%, la temperatura la mantuvieron en 23.2°C, así como la intensidad de la luz en un lapso de 30 días decreció a 32500 ppm .

En el análisis el tratamiento con zacate decreció a 129745 HTP por kg de s.s de una concentración inicial de 191648 HTP por kg de suelo seco.

Aunque para mejores resultados de biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos y con un periodo de tiempo mas corto se suele combinar la adición de nutrientes con microorganismo especializados, como es notorio en la comparación de las figuras 26 y 27.

7.7 Bioensayo de toxicidad

Los tratamientos utilizados para la prueba final de toxicidad se describen en la metodología de la sección 4, excluyendo el tratamiento con zacate ya que este ya contaba con semillas y resultaba difícil sembrar además las de *Phaseolus vulgaris*.



Figura 28. Ejemplo de siembras de las semillas de *Phaseolus vulgaris*



Figura 29. Tratamientos utilizados para el bioensayo de toxicidad, cada tratamiento contó con 40 semillas de *Phaseolus vulgaris* expuestos 12 horas luz/12 horas oscuridad por un lapso de 15 días.

Para el análisis de los datos del bioensayo, se tomó como el 100% el total de semillas germinadas en nuestro suelo testigo que corresponde a 20 semillas (suelo sin contaminación de HTP), dentro del periodo de 15 días, para poder comparar como respondieron los diferentes tratamientos; bioaumentación y bioestimulación.

Bamgbose y Anderson (2015), evaluaron la toxicidad de tres diferentes biodisels en un suelo contaminado de forma artificial con: metil éster de ricino, etil éster de ricino y metil éster de cártamo, utilizaron alfalfa (*Medicago sativa*), lechuga (*Lactuca sativa* L.), rábano (*Raphanus sativus*) y pasto de trigo (*Triticum aestivum*) midiendo la germinación a los 14 días y calculando los resultados en base al porcentaje de germinación, ellos concluyeron que el índice de germinación está directamente relacionado con el género de planta utilizado en el bioensayo en su estudio el rábano tiene un mayor potencial de supervivencia y la tolerancia a altas concentraciones de contaminante, por esta razón se decidió utilizar *Phaseolus vulgaris* ya que es una planta muy sensible y de rápido crecimiento; es importante mencionar que en este tipo de análisis en los que se involucran plantas siempre se toma como factor principal la germinación de las semillas ya que ésta es considerada la etapa crítica del desarrollo de la planta, por su sensibilidad a los contaminantes del ambiente muchos autores han reportado baja germinación de plantas en suelos contaminados con petróleo o sus derivados (Adam and Duncan, 2002; Ogbo, 2009).

Los porcentajes de germinación obtenidos con respecto al suelo testigo fueron los siguientes (Tabla 19):

Tabla 19. Porcentajes de germinación obtenidos.

Tratamiento	Número de semillas germinadas	% de germinación con respecto al testigo
Suelo testigo	20	100
ATENUACIÓN NATURAL	0	0
ASISTIDA		
BIOAUMENTACIÓN		
Suelo + consorcio	6	30
Suelo + consorcio + landfarming	6	30
Suelo + consorcio + biofertilizante	2	10
Suelo + consorcio + bokashi	11	55
Suelo + consorcio + alga	3	15
BIOESTIMULACIÓN		
Suelo + landfarming	3	15
Suelo + bokashi	6	30
Suelo + biofertilizante	2	10
Suelo + alga	3	15

Para ambas metodologías el tratamiento con mayor índice de germinación fue el bokashi, esto se puede atribuir a la alta cantidad de nutrientes que provee a la planta como se muestra en la tabla de su composición (sección 4.1), es muy notorio que en los tratamiento de bioaumentación hay una respuesta más favorable para el crecimiento de las plantas por la acción en conjunto de los microorganismos y nutrientes adicionados, sin embargo es importante destacar que en los tratamientos con bioestimulación también hubo crecimiento lo que nos indica que los tratamientos físicos empleados (landfarming), la humedad estable así como los nutrientes adicionados al suelo se ven directamente

involucrados en el cambio de las características físicas y químicas del mismo ayudando de manera positiva, aun y cuando la concentración de HTP no se haya visto reducida considerablemente y esto se puede comprobar con el comportamiento del pasivo ambiental que no permitió que hubiese germinación . La emergencia de las plantas más representativa se da entre los días 5 y 6, esto puede atribuirse a la capa hidrofóbica formada por los derivados del petróleo disminuye la retención del agua hasta en un 50 % con respecto a los suelos no contaminados (Li *et al.* 1997, Sawatsky y Li 1997).

7.8 Análisis del ciclo de vida del proceso de biorremediación propuesto

Con el fin de demostrar la sustentabilidad del proyecto, se realizó un análisis del ciclo de vida el cual plantea manejar los residuos en una forma sustentable desde el punto de vista ambiental minimizando todos los impactos asociados con el sistema de manejo (Forum Ambiental,2003).

Este método está basado en la norma ISO 14040 (International Organization for Standarization), que determina cuatro fases o etapas básicas para los estudios de ACV : definición del objetivo y alcance, análisis de inventario, evaluación de impacto y la interpretación de resultados como se ilustra en la figura 30 .

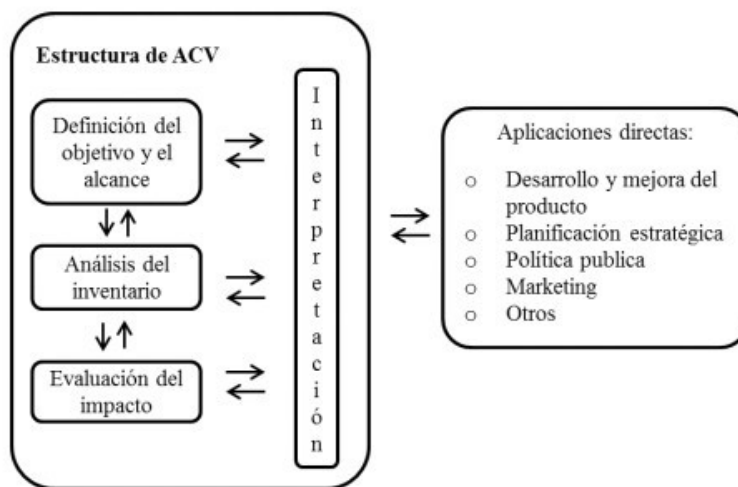


Figura 30. Fases del análisis del ciclo de vida ISO 14040.

Durante la parte más importante del proyecto, hay que mencionar que 1) no se contaminó el suelo de forma artificial, es decir se emplearon muestras reales de un caso severo de contaminación por HTP 2) El consumo energético fue mínimo ya que solo se utilizó un rotaevaporador para las extracciones de HTP, ya que el experimento se llevó a cabo a temperatura ambiente, 3) el solvente utilizado para la extracción de HTP, fue reciclado generando un mínimo de residuos tóxicos.

De esta manera es posible sugerir la autosustentabilidad ambiental y económica del proceso.

7.9 Disposición de residuos generados

Los residuos generados durante el desarrollo experimental, fueron dispuestos de acuerdo al procedimiento establecido para la clasificación de residuos peligrosos de la Facultad de Ciencias Químicas, UANL, por medio de los contenedores proporcionados por el departamento de Medio Ambiente y Seguridad, mismo que se aseguró de llevar a cabo las labores pertinentes de almacenaje previo a la disposición final de residuos .

- Medios de cultivo, caldos nutritivos y placas petri, con microorganismos:

Se realizó la esterilización correspondiente en autoclave y se dispuso en la bolsa de residuos peligrosos biológico infecciosos de desechos biológicos .

- Colorantes y lugol:

Se dispusieron en el contenedor para dichos residuos.

- Solventes orgánicos:

El cloruro de metileno no reutilizable se dispuso en el contenedor de solventes orgánicos halogenados.

- Hidrocarburos totales del petróleo:

Se dispusieron los residuos en el contenedor E orgánico al que pertenecen residuos muy tóxicos, cancerígenos, orgánicos.

- Otros residuos generados como guantes, gasa, papel secante; etc.

Se dispusieron en la cubeta verde de basura industrial.

CONCLUSIONES

1. El consorcio bacteriano hidrocarbonoclasta aislado posee capacidades metabólicas para tolerar altas concentraciones de petróleo que van del 1 al 4% en 1000 mL de medio mineral Bushnell Haas y agar petróleo utilizándolo como única fuente de carbono. Estas características permiten considerar dicho consorcio como una posible alternativa para conformar una efectiva aplicación en campo.
2. Entre la gran diversidad de géneros bacterianos encontrados durante el aislamiento de los consorcios se encontraron en su mayoría bacilos pertenecientes el género Gram positivo, y escasos Gram negativo, esto se debe a que son pocas las especies capaces de vivir con hidrocarburos como fuente de carbono, por tal motivo se da un aumento de la comunidad microbiana predominante y un decremento en la diversidad.
3. El petróleo crudo adicionado al suelo metalófilo mostró un efecto directo sobre el crecimiento bacteriano de los diferentes tratamientos: T1, T2 y T3; siendo el T2 (25% petróleo crudo) el que mostró mayor crecimiento de microorganismos capaces de desarrollarse bajo estas condiciones con un total de 6 aislados, seguido por el T3 a una concentración del 50% con un total de 5 aislados y por último el T1 con una concentración del 10% de petróleo solo con 4 aislados, lo cual sugiere que los microorganismos expuestos con anterioridad a cierto tipo de contaminante, en este caso metales pesados, son capaces de desarrollar mecanismos para subsistir en ambientes aún más extremos, con un contaminante totalmente diferente.
4. Los consorcios bacterianos BHCC' s y metalófilo mostraron buena tolerancia y crecimiento en el medio de sales minerales Bushnell Haas con concentraciones de petróleo del 1% al 4%, siendo el consorcio BHCC' s el que mostró mayor capacidad de supervivencia bajo estas condiciones.

5. El suelo contaminado usado para la prueba final de biorremediación presentó niveles de contaminación de $191,648 \text{ mg kg}^{-1}$ de HTP suelo seco, lo que es casi 17 veces más de lo que marca la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 ($11,500 \text{ mg kg}^{-1}$ suelo seco) para zonas industriales. Esto refleja un caso de contaminación extrema para el pasivo ambiental.
6. En general, los tratamientos con la adición del consorcio BHCC's (bioaumentación) presentaron un mayor porcentaje de remoción con respecto al tratamiento de ANA, aumentando su eficiencia hasta en un 400% (suelo+consorcio 139%, suelo+consorcio+landfarming 170%, suelo+consorcio+bokashi 157%, suelo+consorcio+biofertilizante 255%, suelo+consorcio+alga 223% y suelo+consorcio+zacate 348%) y los tratamientos pertenecientes a la técnica de bioestimulación (suelo+landfarming 86%, suelo+bokashi 100%, suelo+biofertilizante 61%, suelo+alga 336%, y suelo+zacate 477%).
7. El análisis de varianza de una vía realizados a las concentraciones de HTP después de los días 21 y 30 para cada uno de los tratamientos, mostró difieren significativamente respecto a las variaciones entre las repeticiones realizadas (prueba F), además de quedar confirmado por el MANOVA.
8. El consorcio BHCC's aislado mostró un índice de remoción del 139% en un suelo contaminado por HTP ($191,648 \text{ mg kg}^{-1}$), en un lapso de 30 días con una $k = 3.55 \times 10^{-3} \text{ días}^{-1}$ ajustándose a un modelo cinético de primer orden, lo que indica que dicho consorcio podría llegar al LMP en un lapso de 827 días.
9. Dentro de los tratamientos evaluados se observó que, en general los de mayor capacidad de remoción fueron los pertenecientes a la técnica de bioaumentación, siendo favorecidos por la adición de los microorganismos especializados y los nutrientes empleados.

10. Dadas las características de contaminación extrema del sitio, durante el periodo experimental no se logró la biorremediación del suelo, pero se logró degradar hasta un 348% mediante bioaumentación y un 477% de la concentración inicial mediante bioestimulación con el tratamiento que incluye zacate, en comparación con el tratamiento de atenuación natural asistida. Esto es un avance favorable dada la capacidad de las bacterias evaluadas para crecer en dicho suelo, y el corto periodo de duración del experimento.
11. La emergencia y el tamaño de la planta *Phaseolus vulgaris* están relacionados directamente con la concentración de HTP presente en la muestra de suelo, siendo la bioaumentación la técnica con mayor eficiencia de remoción de acuerdo a esta determinación.

RECOMENDACIONES

- Evaluar además de las muestras reales de bioestimulación natural asistida, bioestimulación y bioaumentación un control con suelo estéril contaminado de forma artificial con una concentración de HTP conocida, para comparar las eficiencias de remoción sin la acción de los microorganismos.
- Utilizar un método para la cuantificación de HTP de mayor precisión.
- Estudiar otras especies bacterianas endémicas de México y probar la eficiencia de remoción de HTP.

REFERENCIAS

Acuña K. Villarreal J. Gracia M. Garza T. Chavez B. Rodríguez I. Barrera H. (2004). BTE-OX biodegradation kinetics with MTBE trough bioaugmentation. *Water Science and Technology*. 5(5): 85-92.

Adam G. Duncan H.(2002). Influence of diesel fuel on seed germination. *Environmental Pollution*. 120 (2), 363– 370.

Adams R. Domínguez V. Zavala J. (2015). *Vibrio fischeri* Bioassay for determination of toxicity in petroleum Contaminated Soils from tropical southeast Mexico. *Sains Malaysiana*. 44(3): 337-346.

Adriano D. Bolan N. Koo Bon J. Naidu R. Leile D. Vangrosveld J. Wenzel W. (2002). Natural remediation processes: bioavailability interactions in contaminated soils. 17 th World Congress of Soils Science, Thailand, simposio 42,502,1-12.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (1999). Total petroleum hydrocarbons (TPH). Atlanta: US Departament of Health and Human Services. http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts123.pdf (5 julio 2014)

Agency for toxic substances and disease (ASTDR). (2012). Case Studies in Environmental Medicine Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/pah/docs/pah.pdf> (11 agosto 2014)

American Petroleum Institute (API). (2015). Fuente: <http://www.americanpetroleuminstitute.com/> (26 Marzo 2015).

Anderson T. Guthrie E. Walton T. (1993). Biorremediation in the rhizosphere. *Environmental Science and Technology*. 27:2630-2636

Arranz González J. (2002). Medio ambiente y actividades mineras a cielo abierto. Restauración de espacios degradados por minería a cielo abierto. Memorias del XXI Curso Internacional de Postgrado en Metalogenia. ISPFIGEMPA, Universidad Central del Ecuador. pp.1-26.

Balderas I. Sánchez J. (2015). Biorremediation of soil polluted by 75000 ppm of waste motor oil applying biostimulation and phytoremediation with *Sorghum vulgare* and *Bacillus cereus* or *Burkholderia cepacia*. *Journal of the Selva Andina Research Society*. 6(1): 23-32.

Bamgbose I. Anderson T. (2015). Phytotoxicity of three plant-based biodiesels, unmodified castor oil, and Diesel fuel to alfalfa (*Medicago sativa* L.), lettuce (*Lactuca sativa* L.), radish (*Raphanus sativus*), and wheatgrass (*Triticum aestivum*). *Ecotoxicology and environmental safety*. 122, 268–274.

Bangor University. (2010). Meet the microbes eating the gulf oil spill. <http://www.scientificamerican.com/article/gulf-oil-eating-microbes-slide-show/>

Benavides J. Quintero G. Guevara L. Jaimes D. Gutierrez S. Miranda J. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Revista Nova*, 4(5):82-90

Brito E. Cruz M. Carreta C. Goñi M. Andrade L. Cuevas G. Malm O. Torres J. Simon M. Guyoneaud R. (2015). Impact of hydrocarbons, PBCs and heavy metals on bacterial communities in Lerma River, Salamanca, Mexico: Investigation of hydrocarbon degradation potential. *Science of the total environment*. 521, 1-10.

Botello A. Rendón J. Gold G. Agraz C. (2005). Golfo de México, contaminación e impacto ambiental : Diagnostico y tendencias . Segunda edición. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología. México. Pág. 261-268.

Boopathy R. (2000). Factors limiting biorremediation technologies. *Bioresurse Technologic*. 74,63-67.

Calva L., y Torres R.(2008). Macroalgas y pasto marino, útiles bioindicadores de contaminación por hidrocarburos fósiles en sistemas acuáticos. Laboratorio de ecosistemas costeros, departamento de hidrobiología. UAM.

Candelario Torres M. (2015). Evaluación de bioprocesos para la elaboración de compost tipo Bokashi y generación de biogás utilizando residuos agroindustriales y consorcios nativos microbianos.(Tesis de doctorado). Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

Cardenas Lara Ivan.(2010). Efecto de la aplicación de ácidos orgánico de bajo peso molecular en la biodisponibilidad de Pb y Zn en un sistema de fitoextracción usando *Bassica juncea*, Tesis de maestría inédita. Universidad Autonoma de Nuevo León.

Comisión Nacional de Hidrocarburos (CNH). (2011). La Tecnología de Exploración y Producción en México y en el Mundo: Situación Actual y Retos. Pág: 66.http://www.cnh.gob.mx/docs/dt2_tecnologia.pdf (26 agosto 2014)

Comisión Nacional de Hidrocarburos (CNH). (2015). Fuente: <http://www.cnh.gob.mx/5200.aspx>

Das K. Mukherjee,A (2007). Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from petroleum oil contaminated soil from Northeast India. *Bioresourse Technology*. 98, 1339- 1345.

Dávids M. Muter O. Strikauska S. Grúbe M. Truu J. Kalnenieks U. (2014). Bacteria response to zinc, copper and lead in the presence of diesel oil. *Environmental and Experimental Biology*. 12:68.

Dell' Anno A. Beolchini F. Rocchetti L. Luna M. Danovaro R. (2012). High bacterial biodiversity increases degradation performance of hydrocarbons during bioremediation of contaminated harbor marine sediments. *Environmental Pollution*. 167: 87-92. Pág. 90.

Dejonghe W. Boon N. Seghers D. Top E. Verstraete W. (2001). Bioaugmentation of Soils by increasing microbial richness: missing links. *Environmental Microbiology* . 3(10): 649-657. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1462-2920.2001.00236.x/epdf> (25 junio 2015).

Diario Oficial de la Federación (DOF). (2014). Fuente: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5313544&fecha=10/09/2013 (08 Diciembre 2014).

Doménech Xavier. Peral José. (2006). Química Ambiental de Sistemas Terrestres. Capítulo 5. Editorial Reverté. Pág. 203.

Echeverri G. Manjarrez G. Cabrera O. (2010). Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la bahía de Cartagena, Colombia. *Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. 8(13): 77-86.

Environmental Protection Agency. (1984). Health effects Assessment for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). EPA 549/1-86-013, Environmental Criteria and Assessment Office Cincinnati, OH.

El universal. (2014). Fuente: <http://archivo.eluniversal.com.mx/estados/2014/pozo-pemex-veracruz-1034674.html>

Eweis J. Ergas S. Chang D. Schroeder E. (1999). Principios de biorrecuperación. McGrawHill, Madrid.

Faheed F. Abd-El F. (2008). Effect of *Chlorella vulgaris* as Bio-fertilizer on growth parameters and metabolic aspects of Lettuce plant. *Journal of agricultura and social Sciences*. 4: 165-169.

Food and Agriculture Organization of the United Nations.(FAO).(2015). Fuente:<http://www.fao.org/soils-portal/levantamiento-de-suelos/propiedades-del-suelo/propiedades-fisicas/es/>

Falkenmark M. Rockström J. (2004). Balancing water for humans and nature: The new approach in Ecohydrology. London: Earthscan.

Ferrera R. Rojas N. Poggi H. Alarcón A. Cañizares R. (2006). Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista CENIC*.48 (2):179-187

Francis A. Nancharaiyah Y. (2015). Environmental Remediation and Restoration of Contaminated Nuclear and Norm Sites. Chapter 9. Editorial Elsevier. Pág. 185

Fountoulakis M. Terzakis S. Kalogerakis N. Manios T. (2009). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons and linear alkybenzene sulfonates from domestic wastewater in pilot constructed wetlands and gravel filter. *Ecological Engineering*. 35, 1702-1709.

Fundación Forum Ambiental (2003). “ Análisis del Ciclo de Vida (ACV) ” .

www.forumambiental.org/cast/archivos/eines12.htm

Garnica P. Álvares A. Báez F. (2001). Evaluación de la pérdida de resistencia en concretos asfálticos por contacto de sustancias agresivas. *Publicación Técnica No. 171*: Pág.31

<http://imt.mx/archivos/Publicaciones/PublicacionTecnica/pt171.pdf> (26 agosto 2014)

Gargouri B. Dridi G. Kallet T. Abdelhedi R. Bouazis M. (2014). Application of electrochemical Technology for removing petroleum hydrocarbons from produced water using lead dioxide and boron-doped diamond electrodes. *Chemosphere*. 117:309-315

Gutiérrez Ma. y Zavala C. (2002). Rasgos hidromórficos de suelos tropicales contaminados con hidrocarburos. *Revista Terra*, 20(2):101-111.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57320202>

Hernández Acosta E. Ferrera Cerrato R. Gutiérrez Castorena M. Rodríguez Vázquez R. Rubiños Panta J. Fernández Linares L. (2003). Bacterias y hongos hidrocarbonoclastas de rizósfera frijol y maíz, en un suelo contaminado con petróleo. *Revista Terra*. 21: 493-502.

Holman Y. (2011). Microbes are degrading oil in the dewater from the BP oil spill in the gulf a study by Berkeley lab researches has show.
<http://www.eoearth.org/view/article/164936/>

Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. (INAFED). (2015). Fuente:
<http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM30veracruz/municipios/30153a.html>
(25 junio 2015)

International Agency for Research on Cancer. (2010). Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. (92): 1-819
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol92/mono92.pdf> (15 agosto 2015)

Instituto Nacional de Ecología y Climático. (INECC). (2014). Fuente:
<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/372/fuentes.html> (23 julio 2014)

Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. (INECC). (2015). Fuente:
<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/459/cap1.html>

Jayabarath J. Shyam S. Arulmurugan R. Giridhar R. (2009). Biorremediation of heavy metals using biosurfactants. *International Journal of Biotechnology Applications*. (1) 50:54.

Kadali K. Krishna. Simons L. Keryn. Skuza P. Pawel. Morre B. Robert. Ball S. Andrew. (2012). A complementary approach to identifying the remediation potential of hydrocarbonoclastic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 88: 348–355

Kaplan C., y Kitts. (2004). Bacterial succession in s petroleum land treatment unit. *Applied Environmental Microbiology*. 70(3):1777-1786.

Kumar A, Bisht BS, Joshi V, Dhewa T (2011) Review on Bioremediation of polluted environment: A management tool. *International Journal Environmental Science*, 1(6).

Kriipsalu M. Marques M. Maastik A. (2008). Characterization of oily sludge from a wastewater treatment plant flocculation-flotation unit in a petroleum refinery and its treatment implications. *Journal of Material Cycles and Waste Management*. 10, 79-86.

Latha R., y Kalaivani R. Bacterial Degradation of crude oil by gravimetric analysis.(2012). *Advances in Applied Science Research*. 3 (5): 2789-2795.

La jornada. (2014). Fuente: <http://www.jornada.unam.mx/ultimas/2014/08/20/reporta-pemex-derrame-de-hidrocarburo-en-cadereyta-1992.html>

La jornada .(2014). Fuente: <http://www.jornada.unam.mx/ultimas/2014/08/31/derrame-de-petroleo-en-rio-de-veracruz-mata-peces-en-mas-de-6-km-5190.html>

Leahy J.Colwell R. (1990). Microbial Degradation of hydrocarbons in the environment. American Society for Microbiology. 54(3): 303-305.

Lebkowska M. Zborowska E. Karwowska. Miaskiewicz-Peska. Muszynski A. Naumczyk J. Jeczalik M. (2011). Biorremediation of soil polluted with fuels by sequential multiple injection of native microorganisms: Field-scale processes in Poland. *Ecological Engineering*. 37, 1985-1990.

Ledezma A. Adame M. O’connor I. Villarreal J. (2015).Biodegration Kinetic rates of diesel contaminated sandy soil samples by two different microbial consortia. *Annals of Microbiology*. Pág. 1-12.

Leong S. (2011). Growing with the fermented organic fertilizer “ Bokashi” . Fuente : <http://www.agrowingculture.org/2011/07/growing-with-the-fermented-organic-fertilizer-bokashi-steven-leong/>

Llenque Diaz L. (2011). Isolation and identification of heterotrophic bacteria in soils contaminated with oil from of oleocentros of the city of Trujillo, Peru. *Revista de la Facultad de Ciencias Biológicas*. 31(2): 1-7

Li X., Feng Y. y Sawatsky N. (1997). Importance of soil- water relations in assessing the endpoint of bioremediated soils. *Journal of Plant and Soil* .192, 219-226.

Mackey A. Hodgkinson M. (1996). Assesment of the impact on Naphtalene contamination mangrove fauna using behavioral bioassays. *Bulletin of Environmental contamination and Toxicology*. 56:279-286

Madsen E. (1991). Determining in situ biodegradation: Facts and challenges. *Environmental Science y Technology*.25(10): 1663-1673.

Mahjoubi M. Jaouani A. Guesmi A. Ben S. Jouini A. Cherif H. Najjar A. Boudabous A. Koubaa N. Cherif A. (2013). Hydrocarbonoclastic bacteria isolated from petroleum Contaminated sites in tunisia: Isolation, identification and characterization of the biotechnological potential. *New Biotechnology*. 30 (6): 723-733

Mahalingam P. Sampath N. (2014). Optimization of growth for diesel oil degrading bacterial strains. *Advances in Applied Science Research*. 5(6): 91-96.

Maldonado E. Rivera M. Izquierdo F. Palma D.(2010). Efectos de rizósfera, microorganismos y fertilizacion en la biorremediación y fitorremediacion de suelos con petroleos crudo Nuevo e intemperizado. *Revista CSIC*, 26(2):121-136.http://www.erevistas.csic.es/ficha_articulo.php?url=oai:redalyc.uaemex.mx:15416232001&oai_iden=oai_revista169 (12 marzo 2014).

Martínez A. Rodríguez R. (2013) *In situ* biosurfactant production and hydrocarbon removal by *Pseudomonas putida* CB-100 in bioaugmented and biostimulated oil-contaminated soil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 44(2): 1-11

Martínez S. González E. Pérez L. Gallegos M. Gutiérrez M. (2008) Actividad enzimática de citocromo P450 en *Cyperus laxus* , planta fitorremediadora de suelos con hidrocarburos. Universidad Autónoma Metropolitana. Pág 1.

Margesin, R & F Shinner. (2001). Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Applied Environmental Microbiology*. 67: 3127-3133.

Mastandrea C. Chichizola C. Ludueña B. Sánchez H. Álvarez H. Gutiérrez A. (2005). Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Revista Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 39(1):27-36

Medina, S., M. López y J. Vilorio. (2011). Evaluación de la biofertilización en el cultivo maíz en suelo del estado Guárico. Memorias XIX Congreso Venezolano de la Ciencia del Suelo. SVSC-INIA. Calabozo, estado Guárico. Pág 6 .

Méndez M. Rennola L. Peña P. (2011). Determinación de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) usando CG-FID en suelos de un patio de tanques en desuso situado en Catia La Mar- Venezuela. *Revista Ciencia e Ingeniería*. 32 (1): 31-38

Mench M. Bussiere S. Boisson J. Castaing E. Vangrosveld J. Ruttens A. De Koe T. Bleeker P. Assuncao A. Manceau A (2003). Progress in remediation and vegetation of the barren jales gold mine spoil after in situ treatments. *Plant and soil*. 249 (1): 187-202.

McDonald R. Knox G. (2014). Cold region biorremediation of hydrocarbon Contaminated Soils: Do we know enough?. *Environmental Science and Technology*. 48. 9980-9981

Miliarium (2008): Fuente
<http://www.miliarium.com/Prontuario/TratamientoSuelos/Welcome.asp> (20 febrero 2014)

Mrozik A. Piotrowska Z. (2010). Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of Soils Contaminated with aromatic compounds. *Microbiological Research*. 165, 363-375.

Montoya J. Amusquivar J. Mollo A. Sánchez P. (2002). Efectos ambientales y socioeconómicos por el derrame de petróleo en el río desaguadero. Editorial comunicación. Bolivia. Pág. 123.

Morales Tafoya Oscar .(2014). *Mejoramiento de la biodisponibilidad en un suelo costero para eficientizar la biodegradación de los hidrocarburos intemperizados*. Tesis de Licenciatura Inedita. Instituto Politécnico Nacional. Guanajuato

Mulligan C. Yong R. Gibbs B. (1999). On the use of biosurfactants for the removal of heavy metals from oil contaminated soil. *Environmetal Progress*. 18:50-54.

Tollefson J. (2012). Air sampling reveals high emission from gas field.
Nature International weekly journal of science. 482: 139-140.

<http://www.nature.com/news/air-sampling-reveals-high-emissions-from-gas-field-1.9982>

Ochoa Diana y Montoya Alejandra.(2010).Consortios microbianos: una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias. (18):2

Ogbo, E. (2009). Effects of diesel fuel contamination on seed germination of four crop plants– *Arachis hypogaea*, *Vigna unguiculata*, *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. *African Journal of Biotechnology*. 8 (2): 250-253.

Ommen Gilbert S. (1998). Environmental biotechnology. New York. Editorial Plenum. Pág 213.

Onwurah I. Ogugua V. Onyke N. Ochonogor A. Otitoju O. (2007).Crude Oil Spills in the Environment, Effects and Some Innovative Clean-up Biotechnologies. *International Journal of Environmental Research*,1(4): 307-320.

Ollivier B. Magot M. (2005). Petroleum Microbiology. Ed. ASM. Pág: 3.

Palm C. Sanchez P. Ahamed S. Awiti A. (2007). Soils: A contemporary Perspective. *Environmental Resource*. 32, 99-129.

Petróleos Mexicanos (Pemex). (2008). : Fuente
<http://www.ref.pemex.com/octanaje/23explo.htm>
(10 febrero 2014).

Petróleos Mexicanos (PEMEX) (2014): Fuente
http://www.pemex.com/productos/petroleo_crudo/Paginas/default.aspx#.U_zyz7ywazq
(26 agosto 2014)

Petit K. Colina J. Yegres F. Moran H. Yegres R. (2013). Biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) por hongos aislados de aguas contaminadas con petróleo, podredumbre blanca, y acíbar de *Aloe vera*. *Revista Química Viva*,12 (3):18
<http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v12n3/petit.htm>

Peña J. Barrera B. Ruiz R. Xoconostle B. (2006). Bases moleculares de la fitorremediación de hidrocarburos totales del petróleo. *Revista TERRA*,24(4): 529-539.

Peña H. Reyes I. (2007). Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) *Interciencia*. 32 (8): 560-565.

Pucci G. Acuña A. Tonin N. Tiedemann C. Pucci O. (2010). Diversidad de bacterias cultivables con capacidad de degradar hidrocarburos de la playa de Caleta Córdova, Argentina. *Revista peruana de biología*. 17(2): 237-244.

Presidencia de la republica. (2015). Fuente: <http://cdn.reformaenergetica.gob.mx/4-ley-de-petroleos-mexicanos.pdf>

Phol K., y Leskovsek H. (2002). Biological Degradation of motor oil water. *Acta Chimica Slovenica*. 49, 279-289.

Popescu G. Popescu M. (2014). Effect of the Brown alga *Ascophyllum nodosum* as biofertilizer on vegetative growth in grapevine (*Vitis vinífera* L). *Current trends in natural Sciences*. 3(6): 61-67.

<http://www.upit.ro/uploads/revistastiinte/CTNS%20vol%203%20issue%206/Paper%208.pdf>

Raeid M.M. Abed. Jamal Al-Sabahi. Fatema Al-Maqrashi. Amal Al-Habsi. Manal Al-Hinai (2014). Characterization of hydrocarbon-degrading bacteria isolated from oil-contaminated sediments in the Sultanate of Oman and evaluation of bioaugmentation and biostimulation approaches in microcosm experiments. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 89: 58-66.

Ramírez L. Argüelles R (2004). Atenuación natural en suelos contamiandos con hidrocarburos . *Revista Terra*. 6(2):119-126

Roy A. Baruah R. Borah M. Kumar A. Deka P. Saikia N. Deka M. Dutta N. Chandra B. (2014). Biorremediation potential of native hydrocarbon degrading bacterial strains in crude oil contaminated soil under microcosm under. *International Biodeterioration & Biodegradation*. (94); 79:89.

Reyes I. Bernier L. Antoun H. (2002).Rock phosphate solubilization and colonization of maize rhizosphere by wild and genetically modified strains of *Penicillium rugulosum*. *Microbial Ecology*. 44:30-48.

Salanitro J. Dorn P. Huesemann M. Moore K. Rhodes I. Rise L. Vipond T. Western M. Wisniewski H. (1997). Crude oil bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environmental Science Technology*. 31, 1769-1776.

Santiago I. (2006). The Ecology of oil: Environmental labor, and the mexican revolution 1900-1938. Ed. Cambridge University. Pág. 13

Sarma A. Baruah R. Borah M. Kumar A. Deka H. Saikia N. Deka M. Dutta N. Chandra T. (2014). Bioremediation potential of native hydrocarbon degrading bacterial strains in crude oil contaminated soil under microcosm study. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 94: 79-89.

Schwab A. Su J. Wetzel S. Pekarek S. Banks M. (1999). Extraction of petroleum hydrocarbons from soil by mechanical shaking. *Environmental Science Technology*. 33(11): 1940-1945.

Saval B. (1995). Acciones para la Remediación de Suelos en México. Segundo Minisimposio Internacional sobre Contaminantes del Agua y Suelo. Instituto de Ingeniería. UNAM.
<http://www.cubambiente.com/memorias/2005/04%20I%20CONGRESO%20DE%20GESTION%20AMBIENTAL%20EMPRESARIAL%20RESUMENES%20Y%20TRABAJOS.pdf>
(20 Julio 2014)

Sawatsky N. Li X (1997). Importance of soil-water relations in assessing the end point of bioremediation Soils. *Plant and Soils*.192:227-236.

1.Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2008). Fuente: http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_2008_ing/03_suelos/cap3_1.html

2.,Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2015). Fuente : http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_resumen/03_suelos/cap3.html

3. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (2012). Fuente: <http://web2.semarnat.gob.mx/conocenos/Paginas/quienessomos.aspx>

Serrano A. Gallego M. González L (2006). Assessment of natural attenuation of volatile aromatic hydrocarbons in agricultural soil contaminated with diesel fuel. *Environmental Pollution*. 144: 203-209.

Schroeder A. Domínguez R. García H. (1999). Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano. *Revista terra*.17 (2): 159-174

Souza E. Vessoni T. De Souza R. (2014). Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 89:88-94

Suthamathy N. Seran T. (2013). Residual effect of Organic manure EM Bokashi Applied to proceeding crop of vegetable cowpea (*Vigna unguiculata*) on succeeding crop of radish (*Raphanus sativus*). *Research Journal of Agriculture and Forestry Sciences*.1(1),2-5.

Syakti D. Yani M. Vita N. Siregar S. Doumenq Pierre. Sudiana M. Made. (2013). The Bioremediation Potential of Hydrocarbonoclastic Bacteria Isolated From a Mangrove Contaminated by Petroleum Hydrocarbons on the Cilacap Coast, Indonesia. *Bioremediation Journal*. 7(1):11-20.

Teramoto M. Yeoung S. Ohnishi K. (2013). Specialized Hydrocarbonoclastic Bacteria Prevailing in Seawater around a Port in the Strait of Malacca. *Important Oil Degradation in Tropical Seawater*. 8(6):1-7.
<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0066594>

Tollefson J. (2012). Air sampling reveals high emission from gas field. *Nature International Weekly Journal of Science*. 482:139-140.

Torres, D. Rodríguez H. Yendis A. Florentino y F. Zamora. (2006) . Cambios en algunas propiedades químicas del suelo según el uso de la tierra en el sector El Cebollal, estado Falcón, Venezuela. *Revista Bioagro* 18(2): 123-128.

Vargas M. Romero G. Palencia A. Rivero E. Piñero S. (2013). Toxic equivalency factors of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Valencia Venezuela. *Revista Acta Toxicológica Argentina*, 21(2): 69-77.
http://www.ataonline.org.ar/bibliotecavirtual/acta_toxicologica/vol_21_2/vargas.pdf (18 agosto 2014)

Ubani O. Atagana H. Thantsha M. (2013). Biological degradation of oil sludge: a review of the current state of development. *African Journal of Biotechnology*, 12 (47), 6544-6567.

U.S. Army Science Board. (1995). Infrastructure and Environmental Issue Group, Remediation of Contaminated Army Sites: Utility of Natural Vol.VI No.2 abril - junio 2005 125 L. Corona-Ramírez, R. Iturbe-Argüelles Attenuation. Draft Report, Department of the Army, Washington, D.C

USDA. United States Department of Agriculture. (2015). Fuente: http://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/nj/home/?cid=nrcs141p2_018993

US EPA 3500B. (1996). Organic extraction and sample preparation. SW 846 Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods.

Fuente: <http://www.gtanalytical.com/media/pdf/3500b.pdf>

US EPA 3540C. (1996). Soxhlet extraction organics. SW-846. Test methods for evaluation solid waste physical/chemical methods.

Fuente: <http://www.epa.gov/wastes/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3540c.pdf>

U.S. EPA (1998): National Air Quality and Emissions Trend Report. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

U.S.EPA (2000). Introduction to phytoremediation. EPA/600/h-99/107.National Risk Management Laboratory. Office of Research and Development. Cincinnati.

Volke T. Velasco J. De la Rosa D. (2005) . Suelos Contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación, Secretaria de Medio ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Impreso en México. Pp 19-31.

Volke T.Velasco J. (2002). Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Instituto Nacional de Ecología. Pág 31-46

World Health Organization (1995). Fuente:

http://www.who.int/ipcs/assessment/en/pcs_95_39_2004_05_13.pdf (15 agosto 2014)

Williams P. (2015). Applying risk analysis to two divisive topics: Hydraulic fracking and Marijuana use. Risk analysis. 35 (5) 762:765.

Yaima M. (2011). Biorremediación: una herramienta para el saneamiento de ecosistemas marinos contaminados con petróleo. *Revista de biotecnología aplicada*. 28(2): 69-76.

Ying M. Jie R. Qin G. (2013). Biorremediation of petroleum-contaminated soil by a combined system of bioestimulation-bioaugmentation with yeast. *Environmental Technology* . 35 (4): 391-399.

Zamora A. Ramos J. Arias M. (2012). Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. *Revista Bioagro*, 24(1): 5-12

<http://www.scielo.org.ve/pdf/ba/v24n1/art02.pdf> (4 julio 2014).